



**Università
degli Studi
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA
in
Biologia Evoluzionistica ed Ecologia**

In convenzione con:
Università degli Studi di Parma
Università degli Studi di Firenze

CICLO XXXI

COORDINATORE Prof. Guido Barbujani

Testudo hermanni:
aspetti di genetica e genomica di conservazione

Settore Scientifico Disciplinare BIO/18

Dottorando
Dott. Biello Roberto

Tutore
Prof. Bertorelle Giorgio

Anni 2015/2018



**Università
degli Studi
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA
in
Biologia Evoluzionistica ed Ecologia**

In convenzione con:
Università degli Studi di Parma
Università degli Studi di Firenze

CICLO XXXI

COORDINATORE Prof. Guido Barbujani

Testudo hermanni:
aspetti di genetica e genomica di conservazione

Settore Scientifico Disciplinare BIO/18

Dottorando
Dott. Biello Roberto

Tutore
Prof. Bertorelle Giorgio

(firma)

(firma)

Anni 2015/2018

Abstract	1
Introduzione	4
<i>Testudo hermanni</i>	4
Distribuzione geografica	6
Descrizione morfologica	8
Ecologia della specie	11
Status di conservazione	14
Genetica della conservazione	16
Marcatori molecolari	17
Assegnazioni e test di esclusione per l'assegnazione geografica	20
Traslocazioni	23
Obiettivi	26
Capitolo 1: Assegnazione geografica tramite STR di individui confiscati di origine ignota	28
1.1 Introduzione	28
1.2 Materiali e Metodi	30
1.2.1 Campionamento e metodi di laboratorio	30
1.2.2 Struttura genetica e database di reference	30
1.2.3 Assegnazione di individui di origine sconosciuta	32
1.3 Risultati	33
1.4 Discussione	37
Appendice	40
Capitolo 2: Analisi genetiche di testuggini terrestri con fenotipo <i>hercegovinensis</i> provenienti da allevamento	43
2.1 Introduzione	43
2.2 Materiali e Metodi	47
2.2.1 Campionamento	47
2.2.3 Analisi molecolari	48
2.2.3.1 DNA mitocondriale	48
2.2.3.2 Loci microsatelliti	49
2.2.4 Analisi statistiche dei dati	49
2.2.4.1. DNA mitocondriale	49
2.2.4.2 Loci microsatelliti	52
2.3 Risultati	54
2.3.1 DNA mitocondriale	54
2.3.2 Loci microsatelliti	55
2.4 Discussione	59
Capitolo 3: Confronto tra SNP e STR per analizzare la struttura genetica di popolazioni in <i>Testudo hermanni</i> e sviluppo di un pannello informativo per l'assegnazione geografica	65

3.1	Introduzione	65
3.2	Materiali e metodi	66
3.2.1	Campionamento e genotipizzazione	66
3.2.2	Analisi dei dati STR	67
3.2.3	Analisi dei dati ddRADseq	68
3.2.4	Confronto tra STR e ddRADseq	69
3.2.5	Validazione del pannello STR	69
3.2.6	Selezione di SNPs diagnostici	70
3.2.7	Validazione dei pannelli SNP	73
3.3	Risultati	74
3.3.1	Struttura di popolazione e analisi di diversità con STR	74
3.3.2	Filtering dati ddRADseq e analisi di struttura di popolazione	76
3.3.3	Confronto tra STR e ddRADseq	81
3.3.4	Performance del pannello STR	85
3.3.5	Performance dei pannelli di SNP	85
3.4	Discussione	91
3.4.1	Struttura genetica STR vs. ddRADseq	91
3.4.2	Assegnazioni geografiche STR vs. ddRADseq	93
3.4.3	Considerazioni finali	94
Capitolo 4:	Le traslocazioni come strumento di conservazione	96
4.1	Introduzione	96
4.2	Pianificare una traslocazione	98
4.3	Status delle reintroduzioni	100
4.4	Reintroduzioni: aspetti genetici	102
4.5	Legislazione in Italia	104
4.6	Traslocazioni di testuggini di Hermann: esempi	106
4.7	Animali confiscati: possibili soluzioni	109
4.8	Progetto di reintroduzione della testuggine di Hermann (<i>Testudo hermanni</i>) nel Parco Regionale del Conero (Marche, Italia): motivazioni dell'intervento	113
	Considerazioni finali	118
	Ringraziamenti	120
	Bibliografia	121

Abstract

For the past half century, it has been broadly perceived that the rate of species extinction is increasing and many species are in imminent extinction danger. In this context, genetics provides essential support to conservation biology because it helps to understand the evolutionary background of endangered species and enables the development of better management strategies. The Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*), one of the most endangered reptiles in Europe, is distributed in disjoint populations across Mediterranean Europe. Habitat reduction, together with intensive agricultural practices and forest fires, are major causes of reduction in population size in many Mediterranean areas. Intensive harvesting for pet trade, especially before the 1980s when it was banned, and releases of non-native individuals into local populations, represent additional threats. *T. hermanni* is included in the list of strictly protected fauna species by the Bern Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitat, and the western subspecies *T. h. hermanni* is classified as "Endangered" by the IUCN Red List. Here we (i) increased the understanding of the population genetic structure in wild populations with new microsatellite data from previously unsampled geographic areas; (ii) tested a panel of microsatellite loci (STR) to investigate possible patterns of illegal translocations in a sample of individuals from recovery centers and seizures in Italy; (iii) investigated the genetic relationships of samples from the hypothetical subspecies *T. h. hercigovinensis* (or species *T. hercigovinensis*) with the two commonly accepted subspecies *T. h. hermanni* and *T. h. boettgeri*, using different genetic markers (mtDNA and microsatellite); (iv) studied the genetic structure in wild populations with new markers (SNPs) coming from ddRAD sequencing; (v) identified a small number of diagnostic and informative SNPs to reduce the costs of geographical assignments of individuals of unknown origin; (vi) reviewed the conservation translocation aspects in order to plan a pilot reintroduction project in Italy. With a small panel of STR loci, we were able to assign 70% of tortoises (out of a total of 458 individuals) kept in captivity to their potential areas of origin. We found the presence of eastern subspecies individuals in the Italian peninsula and Sicily wild populations probably due to the wide pet trade that affected this species, with thousands tortoises exported to Western Europe from the Balkan Peninsula. We argued that individuals considered morphologically *T. hercegovinensis* (or *T. h. hercegovinensis*), coming from the Adriatic coast of the Balkan Peninsula, should be classified as *T. h. boettgeri* because there is no genetic divergence that could justify the belonging of these specimens to a subspecies or distinct species. Thousands of new markers

coming from a ddRAD sequencing revealed further insights into the substructure in Western populations, especially in Calabria (South Italy) where we detected three distinct genetic groups. Therefore, we developed a small panel of diagnostic SNPs in order to reduce genotyping costs (estimated to about 10-12 euros per individual). This small panel should be used for the cost-effective selection of hundreds of tortoises kept in captivity and suitable for reintroductions. Considering the concerns about the conservation of *T. hermanni* we believe that this thesis allows a better understanding of the genetic variation patterns in this species and provides a new practical tools useful for the conservation and management of wild and captive individuals.

Nell'ultimo secolo e mezzo, il tasso di estinzione delle specie è cresciuto costantemente e molte specie sono in pericolo imminente di estinzione. In questo contesto, la genetica fornisce un supporto essenziale alla biologia della conservazione perché aiuta a comprendere il background evolutivo delle specie minacciate e consente lo sviluppo di migliori strategie di gestione. La testuggine di Hermann (*Testudo hermanni*), uno dei rettili più a rischio in Europa, è distribuita in popolazioni disgiunte attraverso l'Europa mediterranea. La riduzione degli habitat, insieme alle pratiche agricole intensive e agli incendi boschivi, sono le principali cause di riduzione delle dimensioni delle popolazioni in molte aree del Mediterraneo. La raccolta intensiva per il commercio a scopo domestico, specialmente prima degli anni '80, e il rilascio di individui non nativi nelle popolazioni locali, rappresentano ulteriori minacce. *T. hermanni* è inclusa nella lista delle specie faunistiche rigorosamente protette dalla Convenzione di Berna e la sottospecie occidentale *T. h. hermanni* è classificata come "in pericolo" nella Lista Rossa IUCN. Qui abbiamo (i) migliorato la comprensione della struttura genetica delle popolazioni selvatiche, con nuovi dati provenienti da marcatori microsatelliti, da aree geografiche precedentemente non campionate; (ii) testato un pannello di loci microsatelliti (STR) per indagare su possibili traslocazioni illegali in un campione di individui provenienti da centri di recupero in Italia; (iii) analizzato le relazioni genetiche di campioni della sottospecie ipotetica *T. h. hercigovinensis* (o specie *T. hercigovinensis*) con le due sottospecie comunemente accettate *T. h. hermanni* e *T. h. boettgeri*, utilizzando diversi marcatori genetici (mtDNA e microsatellite); (iv) esaminato la struttura genetica in popolazioni selvatiche con nuovi marcatori (SNP) provenienti dal sequenziamento ddRAD; (v) identificato un piccolo numero di SNP diagnostici e informativi per ridurre i costi delle assegnazioni geografiche di individui di origine sconosciuta; (vi) revisionato gli aspetti delle

traslocazioni a fini conservativi al fine di pianificare un progetto pilota di reintroduzione in Italia. Con un piccolo pannello di loci STR, siamo stati in grado di assegnare il 70% delle tartarughe (su un totale di 458 individui) tenuti in cattività alle loro potenziali aree di origine. Abbiamo trovato la presenza di individui della sottospecie orientale nelle popolazioni selvatiche della penisola italiana e della Sicilia probabilmente dovuto all'ampio commercio di animali domestici che ha colpito questa specie, con migliaia di tartarughe esportate nell'Europa occidentale dalla penisola balcanica. Abbiamo osservato che gli individui considerati morfologicamente *T. hercegovinensis* (o *T. t. hercegovinesis*), provenienti dalla costa adriatica della penisola balcanica, dovrebbero essere classificati come *T. h. boettgeri* perché non esiste alcuna divergenza genetica che possa giustificare l'appartenenza di questi esemplari a una sottospecie o a una specie distinta. Migliaia di nuovi marcatori provenienti da un sequenziamento ddRAD hanno rivelato ulteriori approfondimenti sulla sottostruttura delle popolazioni occidentali, specialmente in Calabria (Sud Italia), dove abbiamo rilevato tre gruppi genetici distinti. Inoltre, abbiamo sviluppato un piccolo pannello di SNP diagnostici al fine di ridurre i costi di genotipizzazione (stimati in circa 10-12 euro per individuo). Questo piccolo pannello potrà essere utilizzato per selezionare centinaia di testuggini tenute in cattività e potenzialmente adatte reintroduzioni in natura. Considerando le preoccupazioni sulla conservazione di *T. hermanni* crediamo che questo lavoro permetta una migliore comprensione della variazione genetica in questa specie e fornisca nuovi strumenti pratici utili per la conservazione e la gestione di individui selvatici e in cattività.

Introduzione

Testudo hermanni

Testudo hermanni (Gmelin 1789) è un rettile appartenente all'ordine Testudines (o Chelonia); ci si riferisce a tale specie col nome comune di testuggine di Hermann o testuggine comune (Fig. 1). È una delle tre specie della famiglia Testudinidae endemiche dell'Europa (Ernst and Barbour 1989). Come le altre tartarughe terrestri europee, è una specie diurna e termofila.



Figura 1. Testuggine di Hermann (*Testudo hermanni*). (studbooks.eu)

La classificazione della specie è da sempre oggetto di dispute sia per quanto riguarda i livelli tassonomici superiori alla specie (van der Kuyl et al. 2002; de Broin et al. 2006b; Parham et al. 2006; Fritz and Bininda-Emonds 2007), sia a livello sub-specifico (Perälä 2002a; Bour 2004a; Fritz et al. 2006). In riferimento alla classificazione a livello sovra-specifico, *T. hermanni* è stata dapprima ascritta al genere *Protestudo* (Chkhikvadze 1970), successivamente al genere *Agrionemys* (Gmira 1995), e infine al genere *Eurotestudo* (de Broin et al. 2006b), proposto essenzialmente sulle basi di caratteri di natura anatomica, morfologica e paleontologica. Studi di filogenesi più recenti, basati su analisi molecolari, hanno invalidato tali classificazioni, eccetto il raggruppamento di *T. hermanni* e *T. horsfieldii* in quello che potrebbe essere considerato un sub-genere distinto (Fritz and Bininda-Emonds 2007). All'interno del gruppo *hermanni*, Bour (2004b) e Perälä (2002b,

2004) hanno proposto il riconoscimento di tre diverse specie: *Testudo hermanni* (Gmelin 1789) per le popolazioni dell'Europa occidentale, *Testudo boettgeri* (Mojsisovics 1889) per la maggior parte delle popolazioni orientali, e *Testudo hercegovinensis* (Werner 1899) per le popolazioni lungo la costa adriatica della Croazia e dell'Albania settentrionale. Tali classificazioni, basate esclusivamente su osservazioni morfologiche, non vengono supportate dalle analisi molecolari recenti, secondo le quali è corretto riconoscere una sola specie, *T. hermanni* (Fritz et al. 2006; Perez et al. 2014). Ad oggi, infatti, la maggior parte degli scienziati riconosce l'esistenza di un'unica specie suddivisa in due sottospecie, in accordo con la sistematica classica. Le due sottospecie vennero primariamente stabilite da Wermuth (1952): *Testudo hermanni hermanni* nella parte a sud della Pianura Padana, e *Testudo hermanni boettgeri* nei territori ad est. Inizialmente tale suddivisione sub-specifica era ovviamente basata sulla sola osservazione di differenze morfologiche, ma i successivi studi basati sul DNA mitocondriale (Fritz et al. 2006) hanno confermato l'esistenza di due principali gruppi all'interno della specie, convalidando lo stato tassonomico delle due sottospecie (Fig. 2). Tali studi hanno evidenziato l'esistenza di 4 gruppi principali: uno comprendente le popolazioni occidentali (Italia, Francia, Spagna, Isole Baleari, Corsica, Sardegna e Sicilia), una seconda unità che raggruppa le popolazioni orientali dei Balcani (Grecia, Bulgaria, Macedonia, Romania), un terzo gruppo di popolazioni presenti lungo la costa Adriatica dell'Europa orientale (Croazia, costa adriatica della Grecia, Isola di Corfù), e una quarta unità localizzata nell'estremo Sud della Grecia, sul versante occidentale del Monte Taigeto, nel Peloponneso (Fritz et al. 2006).

Recenti studi di filogenesi e genetica di popolazioni hanno chiarito lo status di molte popolazioni in Europa; le prime analisi sul DNA mitocondriale hanno evidenziato l'esistenza di due principali cluster di sequenze del gene 12S rRNA (van der Kuyl et al. 2002). Ognuno dei due gruppi può essere facilmente associato alle due sottospecie, e la bassa divergenza genetica tra di essi costituisce una prova contro l'ipotesi che *T. h. hermanni* e *T. h. boettgeri* dovrebbero essere classificate come specie a se stanti (Bour 2004a; de Broin et al. 2006b, a). Ulteriori analisi del DNA mitocondriale, basate sul gene *Citocromo b* (Fritz et al. 2006) suggeriscono l'esistenza di tre principali aplogruppi di *T. h. boettgeri* localizzati approssimativamente in tre differenti aree geografiche. Mentre l'origine monofiletica degli aplotipi delle regioni occidentali del Mediterraneo è ben supportata, per gli aplotipi della regione Balcanica sono stati ottenuti risultati contrastanti (Fig. 2); tale gruppo, infatti, risulta essere monofiletico o parafiletico (rispetto al clade occidentale) a seconda dell'analisi filogenetica utilizzata. Questi risultati implicano un processo di differenziazione non ancora completo, nonostante l'allopatria delle regioni occidentali e balcaniche, e suggeriscono che

tutte le popolazioni di *T. hermanni* sono conspecifiche (Fritz et al. 2006). Le ultime analisi molecolari sui loci microsatelliti in aggiunta al mtDNA, offrono un'ulteriore prova sulla differenziazione a livello subspecifico tra *T. h. hermanni* e *T. h. boettgeri*; i loro corrispettivi areali di distribuzione non si sovrappongono, quindi le due sottospecie possono definirsi allopatriche, con una zona di contatto nell'Italia nord-orientale, vicino alla foce del fiume Po (Perez et al. 2014).

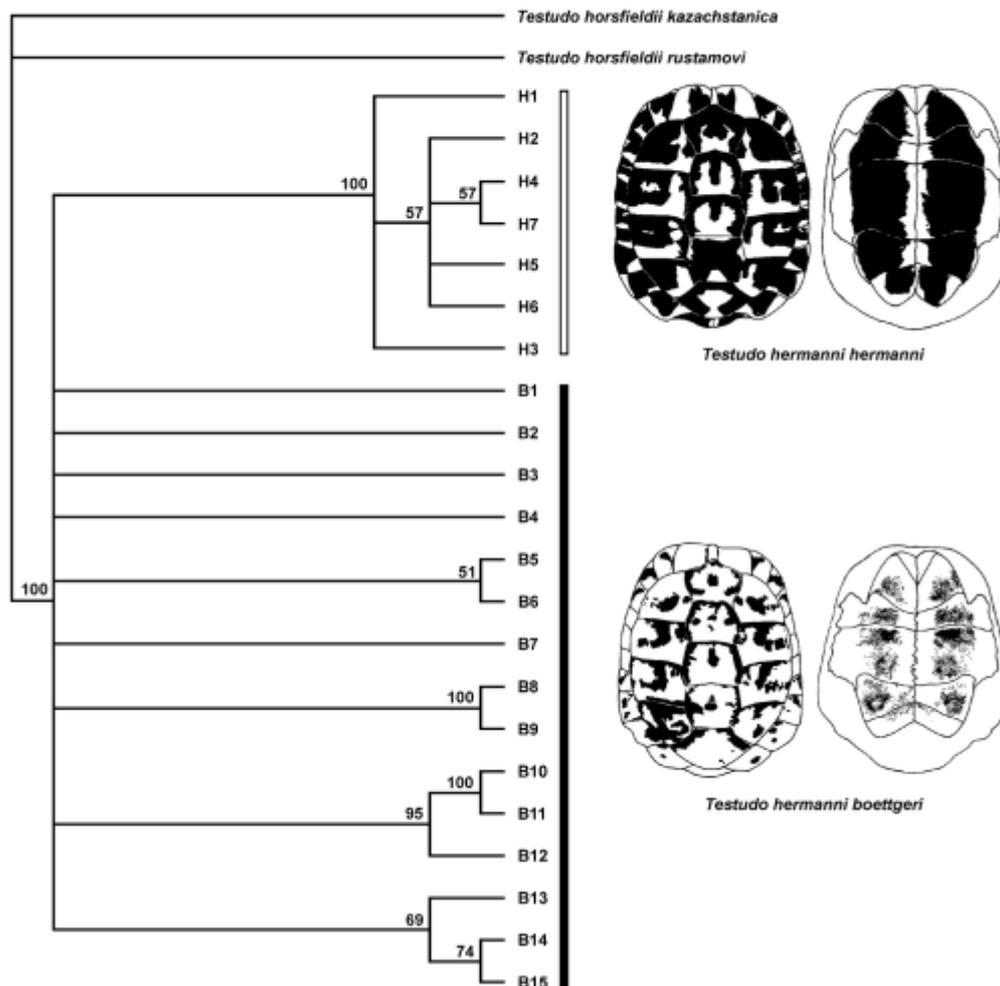


Figura 2. Albero di consenso majority-rule degli aplotipi mtDNA di *T. hermanni*. Gli aplotipi H1-H7 corrispondono a *T. h. hermanni*, B1-B15 a *T. h. boettgeri*. Sono indicati i valori di bootstrap maggiori di 50 (Fritz et al. 2006).

Distribuzione geografica

Testudo hermanni è una delle tre specie di Testudinidae endemiche dell'Europa e occupa un range di habitat relativamente ampio, dalle foreste termofile alle coste, fino a prati, pascoli e macchia mediterranea (Ernst and Barbour 1989). La specie occupa le regioni a clima mediterraneo e meso-mediterraneo dell'Europa meridionale con un areale di distribuzione

che si estende dal Bosforo, ad est, fino alla Catalogna, ad ovest; tale areale è spesso discontinuo e puntiforme soprattutto nelle regioni del Mediterraneo occidentale (Bour 1997; Cheylan 2001). Come già accennato in precedenza, le due sottospecie di *T. hermanni* ufficialmente riconosciute occupano areali piuttosto separati (Fig. 3): *Testudo hermanni hermanni* (Gmelin 1889) occupa la parte occidentale dell'areale tipico della specie ed è diffusa in Francia meridionale, Corsica, Italia peninsulare, Sardegna, Sicilia, Spagna continentale e Baleari; *Testudo hermanni boettgeri* (Mojsisovics 1889) occupa un'area che comprende Italia nord-orientale, Istria, Dalmazia, Erzegovina, Serbia, Macedonia, Albania, Grecia centrale e meridionale, Albania sud-occidentale fino ad arrivare alla Romania e Bulgaria. La zona di contatto tra i due areali si trova nell'Italia nord-orientale, nei pressi della foce del fiume Po; studi precedenti hanno infatti rilevato la presenza di popolazioni di *T. h. boettgeri* nel Bosco della Mesola e nella riserva naturale di Bosco Nordio (Mirimin et al. 2004; Perez et al. 2014).

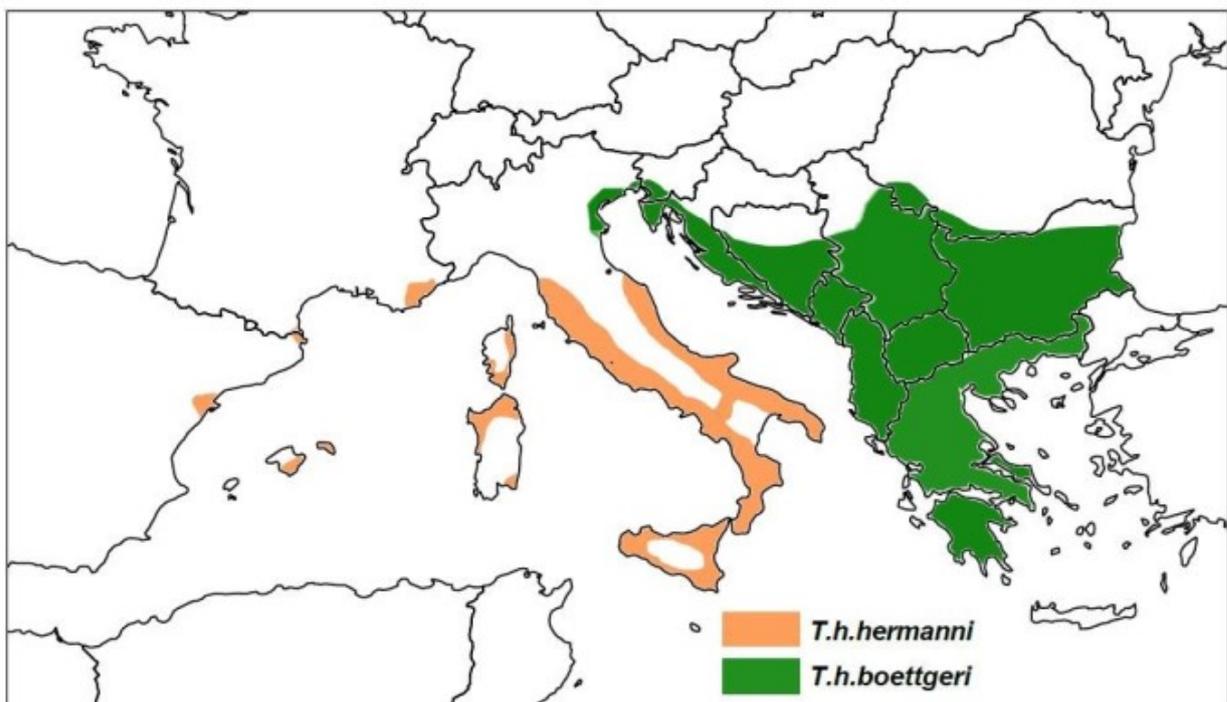


Figura 3. Areale di distribuzione delle due sottospecie di *T. hermanni*. (Riprodotta da Wikipedia)

La distribuzione italiana di questa specie è frammentata e spesso le segnalazioni riguardano individui isolati dei quali non è accertata l'origine autoctona.

Descrizione morfologica

Testudo hermanni possiede un carapace di forma ovale, bombato a cupola, costituito da diverse placche (o scuti) (Fig. 4). Il capo e gli arti mostrano una colorazione che va dal giallo-olivastro al nero, mentre il carapace è di colore giallo-bruno o giallo-verdognolo e presenta macchie di forma geometrica di colore marrone scuro o nero. Il colore del piastrone è giallo e sono presenti macchie scure la cui disposizione e forma rappresentano uno dei caratteri morfologici spesso utilizzati nel riconoscimento delle sottospecie. La lunghezza del carapace negli animali adulti è solitamente inferiore a 25-30 cm anche se le dimensioni variano a seconda delle sottospecie e in relazione al sesso; Gli esemplari maschi presentano dimensioni inferiori rispetto alle femmine ed il loro carapace ha una forma più trapezoidale, il piastrone è più concavo, la coda è più sviluppata e robusta.

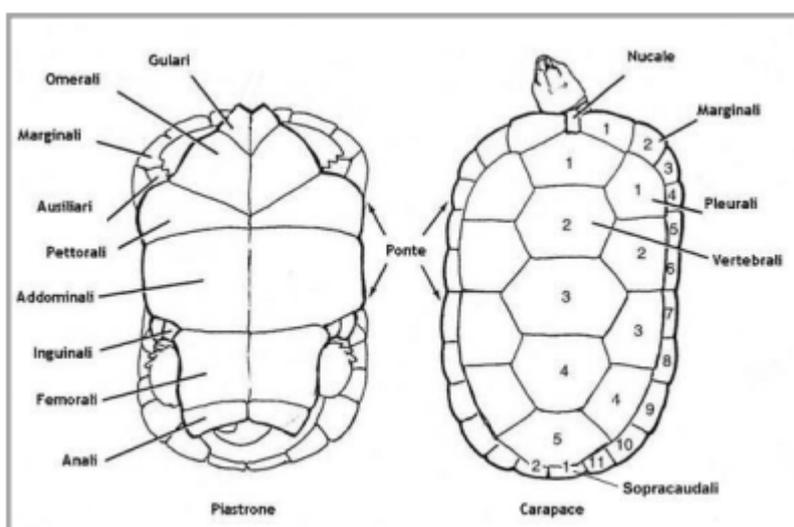


Figura 4. Divisione in scuti del piastrone e del carapace in *T. hermanni*. (geachelonia.org)

I caratteri morfologici che permettono di distinguere *T. hermanni* dalle altre specie del genere *Testudo* sono lo scuto sopracaudale diviso (ad eccezione di alcune popolazioni balcaniche), l'apice della coda ricoperto da un astuccio corneo e la livrea giallo ocra con macchie scure in contrasto. Altri caratteri diagnostici della specie sono l'assenza di tubercoli nella parte interna delle zampe, la presenza di larghe squame sulla parte esterna delle zampe anteriori e uno scuto vertebrale più stretto (Fig. 5). In alcune zone del suo areale, *T. hermanni* può entrare in contatto con due altre specie appartenenti allo stesso genere, *T. graeca* e *T. marginata*, con le quali può venire occasionalmente confusa, specialmente negli stadi giovanili; tuttavia ad oggi non sono stati rilevati casi di ibridazione in natura (Cheylan 2001).

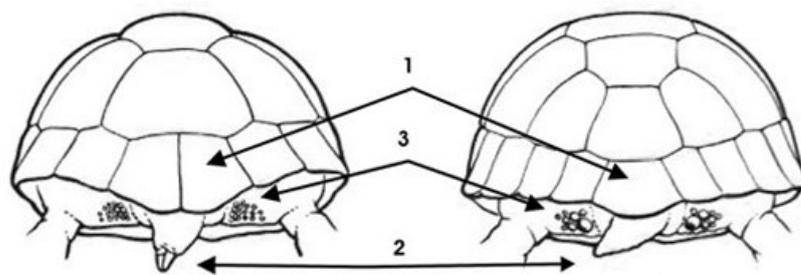


Figura 5. *T. hermanni* (a sx) si differenzia da *T. graeca* (a dx) per la presenza dello scuto sopra-caudale diviso (1), la presenza di un astuccio corneo all'apice della coda (2), assenza di tubercoli sulle zampe posteriori (3). (geachelonia.org)

Testudo hermanni hermanni è la sottospecie con le dimensioni minori, presenta un carapace ovale fortemente bombato, un po' allargato a livello della nona e della decima placca marginale; la colorazione della livrea risulta molto contrastata e brillante, da giallo pallido a giallo arancio, e ornata con motivi neri geometrici abbastanza regolari (Fig. 6). Presenta una macchia giallastra sul dorso del capo e due fasce di macchie nere parallele e continue su tutta la lunghezza del piastrone, che non si estendono però agli scuti golari. *Testudo hermanni boettgeri* è la sottospecie con maggiori dimensioni, il carapace è più appiattito e più trapezoidale, nettamente allargato a livello della nona e decima placca marginale. La colorazione è più variabile e meno contrastata, generalmente giallo-verdastra ornata con macchie grigio-nerastre non ben definite; le macchie del piastrone sono discontinue e sfumate, salvo in alcune popolazioni della Grecia, circoscritte alla regione del Peloponneso, dove il nero copre quasi tutta la superficie degli scuti (Fig. 6). Nella penisola greca infatti, la pigmentazione del piastrone di *T. h. boettgeri* presenta una variazione clinale per cui si passa gradualmente da esemplari di grandi dimensioni e con colorazione tenue, tipici del nord, a esemplari di dimensioni più contenute e col piastrone quasi totalmente nero, presenti a sud. In quest'ultimi, la distribuzione del pigmento scuro appare molto più simile a quella tipica della *T. h. hermanni* e a volte può essere anche più estesa, come dimostra la frequenza di esemplari melanotici (Willemsen and Hailey 1999a). *T. h. boettgeri* è la sottospecie che mostra maggiore variabilità in termini di dimensioni tra le popolazioni (Willemsen and Hailey 1999b). Un ulteriore parametro morfologico usato per la distinzione delle due sottospecie è il rapporto tra la lunghezza della sutura fra le piastre pettorali e la lunghezza della sutura fra le piastre femorali del piastrone: negli esemplari di *T. h. hermanni* la sutura pettorale è minore della femorale, mentre in *T. h. boettgeri* tale rapporto è generalmente superiore a 1 (Fig. 6). Tale carattere però non è sempre affidabile, e comunque non sufficiente, per il riconoscimento sub-specifico; è nota infatti l'esistenza di esemplari in cui tale rapporto è uguale o molto vicino a 1, inoltre alcuni esemplari di *T. hermanni boettgeri*

mostrano una sutura pettorale di dimensioni leggermente inferiori a quella femorale. Un'altra differenza è presente sul quinto scuto vertebrale: *T. h. hermanni* possiede una marcatura ben definita a formare la cosiddetta forma a “buco della serratura”, mentre in *T. h. boettgeri* il quinto scuto vertebrale in genere dispone di un marcatura non distinguibile o riconducibile a qualche simbolo in particolare (Fig. 6). C'è da dire però che, negli esemplari più anziani di *T. h. hermanni*, la forma su citata, può deformarsi e scomparire.



Figura 6. Lunghezza delle suture pettorali e femorali nelle due sottospecie di *T. hermanni* (in alto). Presenza della caratteristica macchia a “buco della serratura” sul V scuto vertebrale in *T. h. hermanni* (in basso). (www.tartaclubitalia.it)

Gli esemplari di *T. hermanni hermanni* sono inoltre caratterizzati dalla presenza di una piccola macchia gialla sulla guancia, per quanto sia possibile osservare la stessa caratteristica anche in alcuni esemplari giovani di *T. h. boettgeri*, ma in questo caso tende a sparire in età adulta.

Negli ultimi anni, biologi e appassionati hanno rivolto la loro attenzione su due forme geografiche: *T. hermanni 'hercegovinensis'* e *T. hermanni 'peloponnesica'*. Quest'ultima possibile sottospecie di *T. hermanni*, è rappresentata da una esigua popolazione che occupa un'area delimitata del Peloponneso meridionale (Penisola di Mani), e attualmente è inclusa nella sottospecie *T. h. boettgeri*. Gli individui di tale popolazione mostrano alcune differenze

di natura morfologica e morfometrica: dimensioni minori rispetto a quelle tipiche mostrate dalla sottospecie orientale, piastrone di colore quasi totalmente nero (carattere simile agli esemplari della sottospecie *T. h. hermanni*), forma degli scuti dorsali e cappuccio corneo caudale più largo (Bour 2004b). In base a tali differenze, riscontrate ad oggi solo in questa popolazione, Bour (1995, 2004b) suggerisce la necessità di una nuova classificazione tassonomica per questa piccola popolazione del sud del Peloponneso. Al di là dell'aspetto strettamente sistematico, tali evidenze offrono nuovi spunti allo studio dell'evoluzione, della storia passata e della presente filogeografia della specie *T. hermanni*; ci si chiede, ad esempio, se le somiglianze tra le popolazioni occidentali e quella del Peloponneso possano essere considerate il risultato di omoplasia, o invece il segno di una parentela diretta che potrebbe implicare l'introduzione antropogenica. Dagli studi molecolari, è risultato che la popolazione isolata del Peloponneso meridionale mostra aplotipi mitocondriali (gene *Cytb*) che differiscono di 9 step mutazionali dal più comune aplotipo dei Balcani orientali (Fritz et al. 2006). Sono comunque necessari maggiori informazioni e studi per chiarire lo status tassonomico della popolazione del Peloponneso, anche se, sia caratteri morfologici che molecolari suggeriscono un certo grado di differenziazione.

Ecologia della specie

Testudo hermanni è una specie diurna e mostra un'attività di tipo unimodale nel periodo compreso tra marzo e metà maggio, e in ottobre-novembre, mentre mostra un comportamento bimodale in estate (da giugno a settembre), quando le testuggini sfruttando le prime ore del mattino e quelle della sera per il foraggiamento, in modo da evitare di esporsi a temperature eccessivamente alte. Il periodo di attività di *T. hermanni* varia in base alla latitudine, alla distanza dal mare e all'habitat colonizzato. In alcune aree mediterranee più calde, nel periodo da luglio a settembre, l'attività può prolungarsi anche dopo il tramonto e le testuggini spendono la maggior parte del tempo praticando il *basking* (esposizione al sole) (Cheylan 1981). Generalmente le testuggini mostrano un'attività più intensa durante le ore mattutine e i maschi risultano più attivi delle femmine in marzo-aprile e da luglio a settembre, ma anche in autunno (Cheylan 2001; Corti et al. 2006). In quanto specie eteroterma, *T. hermanni* è costretta ad un periodo di latenza durante i mesi invernali che trascorre riparandosi sottoterra, al di sotto della fascia soggetta al gelo, in buche scavate nel terreno o anche in tane abbandonate da altri animali (Ferri and Soccini 2015). Solitamente cade in latenza alla fine di ottobre per risvegliarsi tra marzo e aprile. Durante l'ibernazione, le testuggini di Hermann possono tollerare anche temperature esterne di -18 °C nonostante

si interrino a pochi cm di profondità nel suolo (Corti et al. 2011). Gli esemplari di *T. hermanni* che vivono nella zone più calde e secche, per esempio alcune regioni dell'Italia meridionale, possono andare incontro ad un periodo di estivazione, sottraendosi alle sfavorevoli condizioni ambientali causate dalla siccità.

L'home range di un adulto è generalmente di uno o due ettari, e circa la metà nei maschi rispetto alle femmine (Swingland et al. 1986; Hailey 1989; Calzolari e Chelazzi 1991). Le testuggini di Hermann compiono spostamenti frequenti fra le radure e il sottobosco a seconda dei periodi stagionali e delle esigenze trofiche e riproduttive (Mazzotti 2004; Mazzotti et al. 2007). Le testuggini di Hermann coprono distanze maggiori in primavera ed estate rispetto ai periodi di post e pre-ibernazione (Mazzotti and Vallini 2000; Mazzotti et al. 2002). Durante il periodo riproduttivo le femmine possono percorrere da 200 a 300 m (massimo 800 m) per recarsi ai siti di deposizione delle uova (Stubbs and Swingland 1985).

I maschi di *T. h. hermanni* raggiungono la maturità sessuale mediamente a 12 cm di lunghezza, mentre quelli di *T. h. boettgeri* a circa 13 cm (Kwet 2005). Gli accoppiamenti possono avvenire sia in primavera che in autunno e, soprattutto durante quest'ultima stagione, le femmine dedicano più tempo al comportamento di *resting* mentre i maschi risultano essere più attivi, fenomeno che potrebbe essere correlato con la ricerca delle femmine (Corti et al. 2011). È stato osservato che il picco dell'attività sessuale si ha a metà e alla fine del periodo attivo (luglio e ottobre) e sembra essere associata alla spermiazione (fase finale della spermatogenesi), come è stato osservato da Kuchling et al. (1981) i quali evidenziarono, inoltre, la capacità delle femmine di trattenere le cellule spermatiche nel proprio apparato genitale (*sperm storage*) anche per anni.

La deposizione delle uova avviene in particolari zone che mostrano le condizioni edafiche e termiche ottimali, solitamente durante le ore serali, e può durare 2-3 ore; nella sottospecie *T. h. hermanni* ciascuna deposizione è di 1-3 uova, mentre le femmine di *T. h. boettgeri* solitamente depongono da 2 a 5 uova alla volta. Il periodo di incubazione dura circa 60-90 giorni (Cheylan 2001) e la schiusa avviene generalmente alla fine dell'estate, anche se sono possibili svernamenti nell'uovo per far avvenire la schiusa nella primavera successiva. I piccoli alla nascita misurano 30-40 mm e hanno un peso di circa 6-8 grammi (Kwet 2005). La specie si caratterizza per il raggiungimento tardivo della maturità sessuale, per una bassa fecondità, una scarsa percentuale di schiusa e una elevata mortalità giovanile; tali caratteristiche sono però compensate da un alto tasso di sopravvivenza degli adulti (maggiori del 95% in condizioni di bassa predazione antropica) (Cheylan 2001).

La dieta della testuggine di Hermann è composta essenzialmente da vegetali a cui si aggiungono occasionalmente invertebrati, piccoli animali morti, escrementi e ossa (Cheylan 2001). La testuggine di Hermann consuma prevalentemente piante annuali mentre evita i vegetali legnosi, aromatici, resinosi, quelli che contengono lattice e quelli con foglie pubescenti (Corti et al. 2011). È stata osservata in molti esemplari di *T. hermanni* la ricerca attiva di alcune piante tossiche per l'uomo come *Tamus communis*, *Arum* sp. e *Ranunculus* sp. ed è stato ipotizzato che tali alimenti possano venire ingeriti allo scopo di eliminare eventuali parassiti intestinali (Longepierre & Grenot 1999). La testuggine di Hermann si nutre inoltre di frutti di varie specie come *Ficus carica*, *Morus* sp., *Opuntia* sp., *Vitis vinifera*, *Mespilus germanica*, *Arbutus unedo*. A tutti questi vegetali si aggiungono muschi, alghe e anche funghi (*Boletus* sp.), chioccioline e altri invertebrati (Coleotteri e Diplopodi, compresi i Glomeridi). Non è raro il consumo di escrementi di mammiferi (quali cane, volpe, coniglio, gatto e daino).

Nonostante il loro robusto carapace, le testuggine di Hermann, in particolare gli esemplari giovani, sono minacciati da un'ampia varietà di predatori; diversi uccelli rapaci (*Aquila chrysaetos*, *A. heliaca*, *Haliaeetus albicilla*, *Gypaetus barbatus*, *Aegypius monachus*, *Neophron percnopterus*) predano esemplari maturi o immaturi di grandi dimensioni. L'aquila reale è il principale consumatore di testuggine nei Balcani (Andrinos 1987). Tra i predatori di *T. hermanni* vengono annoverati anche molti mammiferi (*Vulpes vulpes*, *Mustela nivalis*, *Sus scrofa*, *Martes foina*, *Meles meles*, *Mustela putorius*, *Canis aureus*) i quali cacciano maggiormente gli individui giovani e le uova; la faina risulta essere il principale predatore di uova di testuggine, seguita a distanza da riccio, volpe e cinghiale (Cheylan 2001).

Gli habitat di *T. hermanni* sono caratterizzati da un clima tipicamente mediterraneo (inverni miti ed estati secche) e possono presentare diversa tipologia di vegetazione. Le testuggine prediligono gli ambienti forestali costieri termofili come foreste xerofile di *Quercus ilex* e *Q. suber*, *Pinus pinea* e *P. pinaster*, ma sono comunque presenti nella macchia mediterranea, sia alta sia bassa, caratterizzata da vari substrati, da quelli calcarei a quelli silicei, sia su terreni in piano oppure su pendici rocciose ricoperte da vegetazione (Corti et al. 2011). *T. hermanni*, in quanto specie eteroterma, predilige habitat assolati caldi e asciutti, in genere ad altitudini fino a 500 m, ma talvolta anche fino a 1800 m. Molte popolazioni italiane di *T. hermanni* sono state osservate in dune costiere cespugliate e in spazi aperti come prati e pascoli, giuncheti, garighe e radure cespugliate. *T. hermanni* è una specie sinantropica e viene comunemente osservata negli oliveti abbandonati, negli agrumeti e negli orti (Corti

and Zuffi 2003; Mazzotti 2004; Sindaco 2006). È diffusa in altre zone antropizzate come campi coltivati, giardini e siepi ai margini dei cortili e dei pascoli. La specie in genere evita le zone acquitrinose, le foreste dense, le coltivazioni intensive e gli habitat ad altitudini troppo elevate (Corti et al. 2011).

Status di conservazione

Le popolazioni di *Testudo hermanni* sono fortemente in declino nella maggior parte del suo range di distribuzione. Dati storici ed archeo-zoologici indicano che tale declino sia iniziato molto presto in epoca antica (ultimo periodo del Pleistocene), specialmente in Francia e Spagna dove la specie era prima largamente distribuita lungo le coste del Mediterraneo (Fèlix et al. 2006; Perez and Serra 2009). La gran parte delle restanti popolazioni in Spagna, Francia ed Italia mostra una distribuzione fortemente discontinua e molte sono in forte calo demografico. Lo status delle popolazioni Balcaniche sembra leggermente migliore, nonostante nella penisola greca e in Bulgaria siano state studiate popolazioni in evidente declino (Hailey and Willemsen 2003; Petrov 2007).

Le minacce alla sopravvivenza di *T. hermanni* possono essere suddivise in due categorie: quelle che hanno un impatto sul suo habitat, che possono portare ad una temporanea o permanente perdita o degradazione dello stesso, e quelle che agiscono unicamente sui singoli individui, senza avere ripercussioni sull'ambiente in cui vivono. La degradazione e la perdita di habitat sono principalmente correlate al massiccio aumento dell'urbanizzazione e allo sviluppo di nuove tecniche agricole; *T. hermanni* è infatti fortemente minacciata dall'estendersi delle monocolture cerealicole e dalla meccanizzazione dei metodi agricoli. Un'ulteriore causa della degradazione dell'habitat è costituita dagli incendi boschivi che causano la morte di elevate percentuali di individui incapaci di fuggire. Nel Sud della Francia, il 55% dell'areale storico della specie è stato soggetto ad incendi almeno una volta dal 1965 ed esiste una forte correlazione negativa tra l'abbondanza di individui e la storia degli incendi boschivi (Cheylan 2004). In conseguenza alla riduzione degli spazi aperti, si assiste ad una concentrazione dei nidi in piccoli spot nei quali la predazione di uova e piccoli può diventare estremamente alta (Madec 1999). La cattura diretta per il commercio di animali rappresenta sicuramente la principale minaccia che affligge i singoli individui e che mostra un maggiore impatto sugli esemplari adulti. Nonostante siano in atto molte campagne di sensibilizzazione, la cattura di esemplari in natura non cenna ad arrestarsi; inoltre, spesso il prelievo di individui avviene non solo a scopo commerciale, ma anche per cause puramente opportunistiche o accidentali. Esiste infatti una forte correlazione positiva tra la frequenza

delle visite pubbliche in un sito e la rarità delle testuggini che vi abitano (Budó et al. 2002). L'ibridazione tra sottospecie, che rappresenta un rischio per l'identità genetica delle popolazioni, è soprattutto legata al rilascio, accidentale o volontario, di individui provenienti da allevamenti in cattività (Bertolero et al. 2011).

Le popolazioni della testuggine di Hermann sono da tempo protette sia a livello nazionale sia internazionale; è infatti una delle specie il cui commercio viene regolamentato dalla normativa CITES (Convention on International Trade of Endangered Species) (Appendice II per gli stati al di fuori della Comunità Europea, Appendice A per gli stati appartenenti alla CE). È una delle specie protette dalla Direttiva Habitat (Annessi II e IV), e dalla Convenzione di Berna (Annesso II). La specie *Testudo hermanni* è inclusa nella Red List dell'IUCN e catalogata come prossima alla minaccia (NT = Near Threatened) (IUCN 2017). Mentre la sottospecie occidentale è classificata come "Endangered" (IUCN 1996). Per questa specie sono in atto molti progetti di potenziamento e conservazione in diversi Paesi europei; alcune iniziative comprendono il ripristino degli habitat o la traslocazione degli animali in ambienti più adatti, per esempio in seguito ad incendi estesi. È ancora oggetto di catture illegali e viene allevata con successo da molti privati. Anche per quanto riguarda lo status delle popolazioni italiane di *T. hermanni*, queste hanno risentito pesantemente della pressione antropica sull'ambiente; in particolare, le coste settentrionali del Mediterraneo sono state ampiamente rimaneggiate e gli habitat naturali elettivi di questa specie sono stati distrutti o alterati da un'urbanizzazione, spesso priva di regolamentazione, in ampie porzioni di territorio. Come avviene nel resto dell'areale europeo, le principali cause di depauperamento delle popolazioni italiane sono gli incendi, le moderne tecniche agricole, le coltivazioni intensive e l'uso massiccio di biocidi, nonché il prelievo in natura a scopo commerciale. Non si esclude infine l'impatto negativo del cinghiale (*Sus scrofa*) che potrebbe arrecare seri danni alle uova e ai giovani (Bernini et al. 2006).

T. h. boettgeri è la sottospecie più soggetta a commercio illegale e più diffusa tra gli allevatori; numerosi esemplari sono stati introdotti in Italia per il mercato clandestino, dall'Albania e dai paesi dell'ex-Jugoslavia (Ljubisavljević et al. 2011). Un totale di 2.615 tonnellate di testuggini (*Testudo* spp.) sono state esportate dall'ex Jugoslavia nel corso del XX secolo (Ljubisavljevic et al. 2011). Questo totale è l'equivalente di circa 2 milioni di esemplari. Le esportazioni prima della seconda guerra mondiale erano relativamente modeste. Sono poi aumentate significativamente dalla metà degli anni '50 in poi e hanno raggiunto un valore di oltre 80 tonnellate all'anno negli anni '60. Le esportazioni di testuggini hanno raggiunto il picco all'inizio degli anni '70. Il più grande valore annuo registrato è stato

di 236 tonnellate (circa 193 mila esemplari) nel 1972 (Fig. 7). Durante gli anni '80, le esportazioni calarono costantemente da un anno all'altro e finirono del tutto nel 1987. I maggiori importatori erano la Repubblica Federale di Germania, l'Italia, il Belgio, il Lussemburgo e la Gran Bretagna. Questi paesi rappresentavano il 77% delle esportazioni totali. Sappiamo inoltre che molti di questi esemplari sono stati liberati in natura durante gli anni passati, soprattutto nel Centro-Nord Italia (Bertolero et al. 2011).

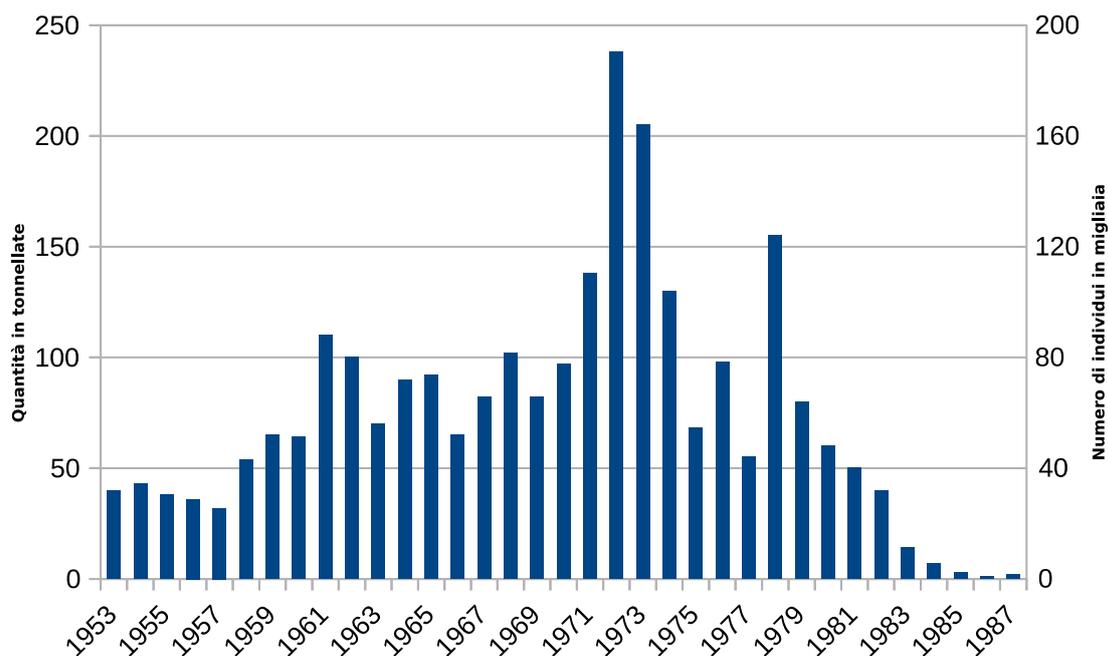


Figura 7. Grafico delle esportazioni annuali di testuggini (*Testudo* spp) dall'ex-Jugoslavia verso l'estero (in tonnellate e in migliaia di esemplari). (Riprodotta da Ljubisavljevic et al. 2011)

Genetica della conservazione

La genetica della conservazione è la disciplina che applica le conoscenze teoriche e pratiche della genetica allo scopo di preservare le specie come entità dinamiche, capaci di evolvere per far fronte ai cambiamenti ambientali, minimizzando in tal modo il rischio di estinzione (Frankham et al. 2004). I principali obiettivi della genetica di conservazione sono la gestione e il monitoraggio genetico di piccole popolazioni, la risoluzione di incertezze di natura tassonomica, la definizione di Management Units (MUs) intraspecifiche; inoltre si avvale delle analisi di genetica molecolare per l'identificazione delle specie e per le indagini di biologia forense (Frankham et al. 2012). Come tutte le discipline che fanno parte della biologia della conservazione, essa è motivata dalla necessità di ridurre gli attuali tassi di estinzione e di preservare la biodiversità. La diversità biologica del pianeta si sta

rapidamente riducendo come conseguenza diretta e indiretta dell'azione antropica; un considerevole numero di specie si è già estinto, e si sta assistendo alla continua riduzione di molte popolazioni e ciò mette a rischio la sopravvivenza delle specie a cui queste appartengono (Frankham et al. 2012). Oggi molte specie richiedono l'intervento dell'uomo per migliorare la loro gestione e garantire la loro sopravvivenza; l'unione internazionale per la conservazione della natura (IUCN) riconosce la cruciale necessità di conservare la diversità genetica in quanto rappresenta uno dei tre livelli fondamentali della biodiversità (diversità genetica, diversità tassonomica, diversità ecosistemica), e in quanto costituisce al tempo stesso il motore e il prodotto dell'evoluzione biologica (McNeely et al. 1990). La diversità genetica ricopre un ruolo chiave nell'adattamento ai cambiamenti ambientali da parte delle popolazioni; le popolazioni di grandi dimensioni in cui viene naturalmente praticato esoincrocio (*outbreeding*), possiedono una diversità genetica notevole, questa però si riduce drasticamente nelle specie in pericolo. Per questo la genetica di conservazione si focalizza principalmente sullo studio dei processi all'interno di popolazioni piccole e frammentate, e sugli approcci pratici atti a minimizzare gli effetti deleteri che agiscono su di esse (isolamento, *inbreeding*, riduzione della fitness, deriva genetica) (Frankham et al. 2012). Un altro obiettivo consiste nel rilevare l'esistenza di ibridazione, un altro fenomeno che può mettere a rischio la sopravvivenza delle specie rare. La genetica della conservazione si basa principalmente sulla teoria della genetica di popolazioni ed evolutiva, e si avvale del DNA come marcatore naturale in grado di identificare individui, popolazioni e specie. Le moderne tecniche molecolari e il recente sviluppo di metodi statistici e computazionali hanno permesso un ulteriore passo avanti di questa disciplina, consentendo di evidenziare situazioni nelle quali la persistenza di una specie è in pericolo per cause genetiche, e di conoscere molti aspetti della biologia di una specie rilevanti per la sua conservazione. I marcatori molecolari più usati oggi nelle analisi di genetica e genomica della conservazione sono il DNA mitocondriale (mtDNA), i loci microsatelliti (STR) e i single-nucleotide polymorphisms (SNPs) (caratterizzati in piccole quantità). Negli ultimi anni inoltre, grazie all'abbattimento dei costi di sequenziamento, si è cominciato anche a sequenziare genomi completi di organismi non modello per studi di genomica di conservazione (per esempio, Benazzo et al. 2017).

Marcatori molecolari

I mitocondri contengono molecole di DNA circolare, a doppio filamento, che vengono ereditate per via materna nella maggior parte delle specie. La diversità genetica può essere

rilevata tramite vari metodi che includono i tagli tramite enzimi di restrizione (RFLP), l'analisi di polimorfismi di conformazione del singolo filamento (SSCP), e il sequenziamento. Questo tipo di marcatore era molto usato in passato, ma comunque conserva un certo potere statistico per identificare grandi differenze tra le popolazioni (Allendorf et al. 2013). Allo scopo di ottenere risultati più precisi ed esaustivi, l'analisi di aplotipi mitocondriali viene spesso affiancata dall'analisi di marker nucleari; in particolare, nell'ambito della genetica di popolazioni, questi sono rappresentati dai loci microsatelliti.

Si definiscono microsatelliti, o short tandem repeats (STR), sequenze ripetute di DNA non codificante, utilizzabili come marcatori molecolari di loci. Ogni locus microsatellite è caratterizzato da 2 tipi di sequenze: sequenze di DNA ripetitivo (che possono essere condivise da vari loci), affiancate da sequenze di DNA unico (le quali definiscono il locus). Gli elementi ripetuti (*repeat motif*) consistono in ripetizioni in tandem di semplici sequenze tipicamente composte da 2-4 nucleotidi ripetute da 5 a 50 volte. I microsatelliti mostrano livelli molto alti di polimorfismo e possono essere presenti molti alleli per locus (marker multilocus). I polimorfismi dei microsatelliti riguardano il numero di ripetizioni del *repeat motif*, quindi la lunghezza dell'intera sequenza; le mutazioni più comuni consistono nella perdita o nell'aggiunta di un'unità di ripetizione, ma talvolta possono coinvolgere anche diverse unità (Weber 1990; Di Rienzo et al. 1995; Primmer et al. 1996). I microsatelliti mostrano tassi di mutazione molto elevati (tra 10^{-2} e 10^{-6} eventi per locus per generazione), soprattutto se paragonati a quelli delle mutazioni puntiformi dei loci genici codificanti; per spiegare l'alta variabilità dei microsatelliti, sono stati proposti due diversi modelli: lo Slippage della DNA-polimerasi e la ricombinazione ineguale. Il primo modello prevede che, durante la replicazione del DNA, la momentanea dissociazione del filamento che si sta replicando sia seguita da un riappaiamento non allineato dei due filamenti, che porta alla formazione di una struttura a forcina la quale verrà risolta dai meccanismi di riparazione del DNA, con un'aggiunta o una delezione dell'unità ripetuta, per ottenere il perfetto allineamento dei filamenti (Levinson and Gutman 1987; Richards and Sutherland 1994). Il secondo modello suggerisce che un evento di conversione genica, o crossing-over ineguale tra cromosomi omologhi, abbia come possibile conseguenza un cambiamento di lunghezza delle sequenze ripetute (Harding et al. 1992; Brohede and Ellegren 1999; Hancock 1999; Jakupciak and Wells 2000; Richard and Pâques 2000). Ad oggi la maggior parte delle evidenze sperimentali vertono a favore del primo modello, tuttavia alcuni studiosi ritengono che la ricombinazione omologa abbia un ruolo nell'instabilità di alcuni microsatelliti (Jakupciak and Wells 1999). La maggior parte dei microsatelliti che vengono comunemente utilizzati per lo studio di popolazioni sono quelli a singolo locus, nei quali entrambi gli alleli

in un eterozigote mostrano espressione codominante. Le analisi di microsatelliti a singolo locus richiedono l'utilizzo di primer specifici per le sequenze che fiancheggiano le unità ripetute. I loci microsatelliti possono essere quindi amplificati tramite PCR e i differenti alleli in uno stesso locus possono essere messi in evidenza con una semplice corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide o di agarosio, in grado di separare frammenti che differiscono per singole coppie di basi. Gli svantaggi relativi all'uso dei microsatelliti includono la comparsa di ombre (*smear*) o *stutter bands*, la presenza di alleli nulli (alleli che non possono essere osservati usando i test standard) e l'omoplasia (lo stesso allele viene riscontrato in due individui non per via di un antenato comune ma a causa di mutazioni indipendenti).

I single-nucleotide polymorphism (SNP) sono definiti in genere come polimorfismi nucleari del materiale genetico a carico di un unico nucleotide. L'identificazione di SNP per specie non modello richiedeva in passato un grosso sforzo e una forte spesa economica. Recentemente sono stati sviluppati diversi metodi che usano high-throughput sequencing che permettono facilmente di trovare SNP distribuiti lungo tutto il genoma, o almeno rappresentativi di quest'ultimo (Davey et al. 2011). Questi metodi stanno cominciando ad essere ampiamente applicati in studi di genetica di popolazione e conservazione (Seeb et al. 2011). È ora possibile ottenere velocemente migliaia di SNP in specie non modello a costi contenuti, perfino se non si hanno informazioni a priori sul genoma della specie. Migliaia di SNP possono essere isolati e genotipizzati allo stesso costo richiesto per genotipizzare solamente 10-20 loci STR. Un metodo di sequenziamento diffuso per identificare SNP è il restriction-site associated DNA (RADseq) (Miller et al. 2007). Il genoma viene frammentato con enzimi di restrizione e il DNA adiacente al sito di restrizione è sequenziato per identificare gli SNP. I loci RAD sono markers anonimi perché la loro posizione all'interno del genoma non è conosciuta. Una derivazione di uno di questi approcci è il double digest RADseq (ddRADseq), che consente di tagliare inizialmente i campioni di DNA in regioni più piccole grazie a due enzimi di restrizione, e successivamente selezionare per dimensione un numero limitato di essi da sequenziare (Peterson et al. 2012). Questa tecnica, seguita dalle tecnologie di sequenziamento di Next Generation Sequencing (NGS) (ad esempio Ion Torrent, Illumina Solexa) produce un numero incredibilmente elevato di SNP con costi relativamente ridotti.

Sebbene i singoli loci microsatelliti (di solito con più di 2 alleli per locus) abbiano un maggiore potere informativo rispetto a un singolo SNP, quando vengono usati genotipi multilocus, gli SNP possono avere prestazioni migliori dei microsatelliti sia per inferire la

struttura della popolazione che per i test di assegnazione. Secondo Hess et al. (2011) i loci microsatelliti sarebbero migliori per scoprire la recente struttura genetica delle popolazioni, mentre gli SNP si comportano meglio con eventi avvenuti non in tempi recenti. Questo potrebbe spiegare il perché analisi di struttura di popolazione, confrontando i due marcatori, hanno dato risultati diversi nel caso degli orsi neri (Puckett and Eggert 2016), dei cani domestici (Karlsson et al. 2007) e delle zanzare (Rašić et al. 2014). I vantaggi dei microsatelliti rispetto agli SNP sono legati soprattutto a un più alto tasso di mutazione che porta ad avere più alleli (quindi contenuto informativo) per locus. D'altra parte gli SNP sono preferibili per l'ampia distribuzione lungo tutto il genoma e la standardizzazione del processo d'identificazione. Con entrambi i marcatori però possiamo avere costi elevati e necessità di conoscenze bioinformatiche (Ogden 2011).

Gli SNPs sono molto utili per esaminare la diversità genetica, la differenziazione delle popolazioni, l'ibridazione, la conservazione e l'impatto delle invasioni biologiche (Van Bers et al. 2012; Olsson and Korpelainen 2013; Monzón et al. 2014). Pertanto, questi tipi di marcatori ci danno la possibilità di indagare il genoma delle specie a rischio, e non solo, a un livello che prima era inaccessibile e a contribuire a svelare lo status, la struttura e la storia delle popolazioni, al fine di gestire ed elaborare un piano di conservazione appropriato ed efficace (Monzón et al. 2014). Recenti studi inoltre hanno permesso di limitare ancor di più i costi, ottenendo prima diverse migliaia di SNPs dai loro campioni, e quindi selezionando quelli più informativi per limitare il numero di loci (da migliaia a decine) da sequenziare per ulteriori applicazioni (Hess et al. 2015; Sylvester et al. 2018).

Assegnazioni e test di esclusione per l'assegnazione geografica

I test di assegnazione sono dei metodi statistici con importanti applicazioni in studi di tipo ecologico e conservazionistico. Queste analisi si concentrano su scale temporali recenti e sono soprattutto implementate per risolvere problemi pratici e gestionali. Sono stati sviluppati per assegnare individui, o gruppi di individui, a una popolazione di origine; ciò può essere eseguito con dati genetici multilocus (ad esempio STR, SNP) o con informazioni aggiuntive provenienti dalla morfologia. Le ipotesi alla base di questi metodi sono che ogni potenziale popolazione di origine sia stata campionata, e al suo interno i loci siano in equilibrio di Hardy-Weinberg.

Un approccio per inferire l'origine di un campione è implementato nel software GENECLASS2 (Piry et al. 2004): a partire dal genotipo multilocus di un individuo da

assegnare, la probabilità di osservare quel genotipo, o uno score proporzionale a questa probabilità, è calcolata per ogni potenziale popolazione di origine; l'individuo sarà assegnato alla popolazione dove il genotipo ha il più alto score o probabilità. Esistono tre criteri principali per inferire l'origine di un individuo: il primo utilizza la distanza genetica tra il soggetto in esame e le popolazioni di riferimento, in questo caso l'assegnazione andrà alla popolazione più vicina. Gli altri due approcci utilizzano direttamente le frequenze alleliche per stimare la probabilità che un genotipo multilocus sia generato da qualsiasi potenziale popolazione di sorgenti: l'approccio di frequenza applica l'equazione di Paetkau et al. (1995), mentre il Bayesiano implementa il metodo precedente con un approccio bayesiano che permette di essere meno sensibile alle deviazioni dalle reali frequenze alleliche della popolazione dovute per esempio a campioni di piccole dimensioni (Rannala and Mountain 1997). I due metodi basati sulle frequenze alleliche hanno prestazioni migliori rispetto a quelli della distanza, e tra questi, l'approccio bayesiano è leggermente più preciso di quello frequentista (Cornuet et al. 1999).

Un punto debole dei test di assegnazione è che ci sarà sempre una popolazione di riferimento con un punteggio più alto degli altri, anche se non è necessariamente la vera popolazione di origine di un individuo. Di conseguenza, sono stati sviluppati in parallelo i test di esclusione. L'idea alla base di questi test è quella di escludere tutte tranne la popolazione di riferimento e assegnare alla fine il campione ad essa. Per fare ciò, viene applicato un resampling Monte Carlo a ciascuna potenziale popolazione di origine, al fine di simulare campioni di grandi dimensioni (10.000 - 100.000 individui) sulla base delle reali frequenze alleliche di quella popolazione. Il criterio per l'analisi (distanza o likelihood) viene calcolato per ogni individuo simulato e i valori sono ordinati in una distribuzione. Il valore del campione da assegnare viene quindi confrontato con la distribuzione simulata e, se rientra in una delle code per il valore di significatività selezionato (ad esempio $\alpha = 0,05$), quella popolazione di riferimento può essere esclusa come origine dell'individuo. Idealmente questo accadrà con tutte le popolazioni di riferimento eccetto con la vera popolazione d'origine.

Un problema di GENECLASS2 è nella procedura di ricampionamento quando questa è svolta all'interno di ogni popolazione simulata: l'approccio leave-one-out porta all'overfitting (James et al. 2013), nel senso che il modello impara i dettagli e il rumore nei dati "training" ma nella misura in cui lo fa influenza negativamente le prestazioni del modello sui nuovi dati (gli individui da assegnare).

Un altro approccio che permette di svolgere test di assegnazione è STRUCTURE (Pritchard et al. 2000). Questo è sicuramente uno dei software più usati negli studi di genetica di

popolazione, in quanto permette di condurre diversi tipi di analisi: studio della struttura di popolazione, identificazione dei migranti e di individui *admixed*, studio di ibridazione, rilevazione di distinte popolazioni, assegnazione di individui alle popolazioni di origine. Il test di assegnazione implementato in questo software si avvale di un approccio Bayesiano di clustering: tale metodo prevede la suddivisione degli individui della *reference* in K popolazioni (in equilibrio di Hardy-Weinberg e con tutti i loci in *linkage equilibrium*) che rappresentano diversi cluster, ognuno dei quali è caratterizzato da un set di frequenze alleliche per ogni locus. La probabilità per ogni valore di K viene calcolata dalla probabilità *a posteriori* stimata dai dati. Una volta identificato il valore di K , il programma assegna le probabilità di appartenenza ai cluster dei genotipi individuali, in base alla loro composizione. I genotipi le cui frequenze alleliche hanno probabilità non trascurabili di appartenere a due o più cluster sono identificati come potenziali ibridi.

Un altro metodo per inferire l'origine geografica di un gruppo di organismi è l'approccio di machine-learning utilizzato nel pacchetto AssignPOP (Chen et al. 2018) in R. Il metodo di machine-learning richiede, come primo passo, di essere “trained” con un campione rappresentativo di tutte le potenziali popolazioni di origine. A questo punto, ogni genotipo multilocus nel campione ha origini geografiche note. L'obiettivo è quello di creare un algoritmo per classificare ulteriori individui di origine sconosciuta alla popolazione di origine corretta. Il training inizia con l'impostazione della proporzione di individui di origine conosciuta selezionati casualmente come individui “training” (cioè i loro genotipi multilocus saranno studiati per le loro caratteristiche intrinseche e quindi aiuteranno a caratterizzare la popolazione di riferimento da cui provengono). I restanti soggetti, in ogni popolazione di riferimento del campione originale, saranno il gruppo “test”. Questo significa che una volta terminata la fase preliminare il programma farà finta di non sapere da dove provengono questi genotipi e assegnerà quindi ogni individuo alla popolazione con tratti genetici più simili. In questo modo, la precisione dell'algoritmo derivato viene valutata per le applicazioni seguenti. Il training finisce così con questa fase di auto-assegnazione; l'assegnazione geografica dei campioni di origine sconosciuta può quindi essere eseguita sulla base delle informazioni acquisite durante la fase di training.

AssignPOP si basa su un metodo di resampling che consente di creare un dataset “training” bilanciato in termini di dimensioni del campione e di separare un numero ragionevole di genotipi come dataset “test”. Si può scegliere tra un metodo K-fold (Rodriguez et al. 2010) o Monte Carlo (Xu and Liang 2001). Il K-fold divide ogni popolazione di riferimento in gruppi K con gli individui equamente distribuiti tra loro. Uno alla volta, ciascuno dei gruppi

K rappresenta il gruppo “test” mentre i restanti (K-1) sono i gruppi “training” (verrà quindi eseguito un totale di test K). Il metodo di Monte Carlo divide invece casualmente, ad ognuna delle centinaia di migliaia di ripetizioni, gli individui appartenenti a ciascuna popolazione d’origine in due gruppi, uno appartenente al training e l’altro al test. La proporzione di individui inclusi nel “training” può essere personalizzata. Questo viene ripetuto per centinaia di migliaia di volte. Il “training” termina con la fase di self-assignment; l’assegnazione geografica su individui di origine sconosciuta può quindi essere eseguito in base alle informazioni acquisite durante il “training”.

Traslocazioni

L’uomo ha trasportato animali e piante da un luogo all’altro per millenni. Ci sono diversi esempi documentati di rilasci della fauna selvatica per creare nuove risorse alimentari, per il controllo biologico dei parassiti e per ragioni estetiche (Griffith et al. 1989; Green 1997), comportando spesso il rilascio di specie al di fuori dei loro range naturali (Vitousek et al. 1997). Il movimento di specie autoctone può anche comportare il rilascio di animali entro i loro limiti naturali per ricostituire le popolazioni cacciate, risolvere i conflitti uomo-natura (Fischer and Lindenmayer 2000), o per alimentare industrie non di consumo, come per esempio il turismo naturalistico.

La reintroduzione di specie a soddisfare un obiettivo di conservazione o restauro della biodiversità è un’attività relativamente recente che si è sviluppata come conseguenza della crescente consapevolezza globale della necessità di conservare la diversità biologica di fronte alle estinzioni di specie.

È difficile identificare la prima vera traslocazione a scopo conservazionistico, ma esempi potrebbero essere:

- il rilascio alla fine del XIX secolo di numerosi uccelli (non volatori), tra cui il kakapo, dalla Nuova Zelanda (terraferma) a piccole isole neozelandesi prive di predatori, da parte di Richard Henry (Hill and Hill 1987);
- il rilascio nel 1907 di 15 bisonti americani (*Bisonte bisonte*), in una riserva di nuova costituzione in Oklahoma (Kleiman 1989).

Per la sua attenta pianificazione, per la valutazione preliminare dei rischi e per il forte sostegno delle comunità locali, il progetto di rilascio dei bisonti americani poteva essere considerato un modello per le traslocazioni eseguite nei decenni a seguire (Beck 2001).

Purtroppo non sempre questo è successo e molte traslocazioni hanno spesso coinvolto il rilascio di animali con lacune nella pianificazione e assenza di un monitoraggio post-rilascio.

Una maggiore consapevolezza della traslocazione come valida opzione di conservazione è stata raggiunta dalle reintroduzioni di alcuni vertebrati carismatici negli anni '70 e '80, tra cui l'orice arabo (*Leucoryx oryx*) in Oman (Stanley Price 1989), la grande scimmia leonina (*Leontopithecus rosalia*) in Brasile (Kleiman and Mallinson 1998), e il falco pellegrino (*Falco peregrinus*) nel Nord America (Cade and Burnham 2003).

Le traslocazioni, e le reintroduzioni in particolare, sono anche viste come un evento pubblico, in particolare perché la manipolazione, il trasporto e il rilascio di animali sono eventi mediatici. I destini delle popolazioni reintrodotte attirano invece poca attenzione da parte dei media. I dati disponibili sulle traslocazioni della fauna selvatica, avvenuti negli anni '70 e '80, suggeriscono che nella maggioranza dei casi non si è ristabilita una popolazione vitale (Griffith et al. 1989; Wolf et al. 1996). Erano però rilasci mal concepiti, che hanno spinto la formazione del *Reintroduction Specialist Group* (RSG) con l'appoggio della *World Conservation Union's* (IUCN) *Species Survival Commission* (SSC) (Stanley Price and Soorae 2003). L'RSG fu creato nel 1988 per fornire indicazioni per aumentare il numero di progetti di ripristino della fauna selvatica a livello globale. Dal 2018 l'RGS ha cambiato nome in *Conservation Translocations Specialist Group* (CTGS).

Il primo workshop di pianificazione strategica dell'RSG si è tenuto nel 1992 e ha portato alla formulazione delle *Guidelines for Reintroductions and other Conservation Translocations* (IUCN 1998), recentemente aggiornate (IUCN 2013). Una delle risoluzioni del secondo workshop di pianificazione strategica dell'RSG, svoltosi nel 2002, indicava come non era più sufficiente soltanto incoraggiare il monitoraggio nei progetti di reintroduzione ma che l'RSG avrebbe dovuto fornire una direzione di ricerca strategica nella biologia della reintroduzione. Questa risoluzione ha portato a un simposio (*Developing the Science of Reintroduction Biology*) al *Third International Wildlife Management Congress* nel 2003. Inoltre negli ultimi 25 anni si è inoltre definita la biologia della reintroduzione come disciplina grazie a delle pubblicazioni molto importanti (v. Serena 1994; Seddon et al. 2007; Armstrong and Seddon 2008).

Grazie a queste iniziative, zoo, governi e organizzazioni private hanno cominciato a promuovere sempre di più reintroduzioni, introduzioni e ripopolamenti per la conservazione o la caccia. Di conseguenza c'è stato un recente aumento significativo del numero dei progetti di reintroduzione. Spesso però questo è avvenuto senza considerare gli aspetti

genetici come parte integrante, nonostante le linee guida della IUCN considerino necessario conoscere il profilo genetico di ogni individuo rilasciato in natura (IUCN 2013).

La genetica può fornire potenti strumenti per aiutare i progetti di reintroduzione e l'aumento delle popolazioni selvatiche. In generale ci sono due fasi distinte in cui questa può aiutare gli sforzi di reintroduzione. La prima fase è precedente a qualsiasi animale rilasciato in natura. In questa fase i metodi basati sul DNA possono essere usati:

- per capire la struttura delle popolazioni naturali della specie target in modo che la popolazione sorgente appropriata possa essere selezionata;
- per tipizzare geneticamente gli individui di quelle aree in cui si pensa che la popolazione nativa sia estinta per assicurarsi che nessuna di queste continui a perseguire anche se con una dimensione piccola; questo per evitare che vengano rilasciati animali, geneticamente differenti dalle popolazioni locali, che potrebbero portare ad eventi di ibridazione;
- per assistere e migliorare gli sforzi di riproduzione in cattività.

La seconda fase in cui la genetica può essere importante è quella del post-rilascio degli individui.

In questa fase si possono seguire vari approcci:

- seguire gli spostamenti degli individui rilasciati nel tempo (es. analisi delle feci);
- valutare la dimensione complessiva della popolazione reintrodotta dopo il rilascio;
- stimare il numero di animali che si riproducono e che caratteristiche hanno (identificando geneticamente le parentele)

Tuttavia, oltre agli aspetti genetici, incredibilmente utili per ogni tipo di progetto di traslocazione, non vanno dimenticati gli aspetti demografici e sociologici, quelli legati alla salute degli animali, le conoscenze dell'habitat e gli altri approcci ecologici. La combinazione della comprensione dei bisogni dell'habitat di una specie, del controllo di potenziali patogeni dannosi, dei requisiti ecologici, del comportamento, della dinamica delle popolazioni e della genetica sono essenziali per ottenere una traslocazione il più probabile di successo.

Obiettivi

Questo studio è parte di un più ampio progetto che ha come scopo la conservazione e la gestione della *T. hermanni*, coordinato dall'Università di Ferrara, iniziato circa 15 anni fa e che ha già portato a diverse pubblicazioni sulla genetica e l'evoluzione di questa specie.

L'obiettivo generale di questo progetto è quello di aumentare le conoscenze sulla distribuzione della variabilità genetica nella testuggine terrestre, soprattutto nelle popolazioni naturali italiane e in quelle in cattività presenti sul nostro territorio. Inoltre, un altro importante aspetto è quello di ricostruire i processi evolutivi antichi e recenti di questa specie.

Tutte le conoscenze acquisite sulla genetica della *T. hermanni* saranno poi tradotte in un ambito più pratico come quello della biologia della conservazione.

Più nel dettaglio gli obiettivi di questa tesi sono:

- completare le precedenti valutazioni sulla struttura genetica delle popolazioni selvatiche con nuovi dati microsatellite provenienti da aree geografiche precedentemente non campionate;
- testare un pannello di loci microsatellite per indagare eventuali pattern di traslocazioni illegali in un campione di individui provenienti da centri di recupero e sequestri in Italia;
- indagare tramite marcatori molecolari (microsatelliti e un gene mitocondriale) la collocazione filogenetica di esemplari dell'ipotetica sottospecie *T. h. hercegovinensis* (o specie *T. hercegovinensis*);
- studiare la struttura genetica di popolazioni selvatiche con nuovi marcatori (SNP) provenienti da sequenziamento ddRAD;
- selezionare un piccolo numero di SNP diagnostici ed informativi per svolgere test di assegnazione geografica di individui di origine ignota a costi contenuti;
- riassumere brevemente gli obiettivi di un progetto di traslocazione e definire il quadro normativo in Italia, al fine di pianificare un progetto di reintroduzione della *T. hermanni*.

Il progetto ha visto la partecipazione e la collaborazione di molte persone ed enti che hanno contribuito allo sviluppo e alla realizzazione di questo lavoro:

- Stefano Mazzotti (Museo di Storia Naturale di Ferrara)

- Federica Baldo (Veterinaria)
- Oliverio Oliveri, Massimo Trabalza-Marinucci, Gianluca Deli (Università di Perugia)
- Claudia Corti, Marta Biaggini (Università di Firenze)
- Daniele Canestrelli, Mauro Zampiglia (Università della Tuscia)
- Marco Zannini, Elisabetta Ferroni (Parco Regionale del Conero)
- Giovanni Nobili, Fabrizio Bellini (Carabinieri Forestali)
- Maurizio Bellavista (Testudoalbino)
- Emiliano Trucchi, Silvia Fuselli (Università di Ferrara)
- Giulia Fabbri, Camilla Brogini, Maria Luisa Boglino (Tesiisti)
- Caterina Spiezio e Camillo Sandri (Parco Natura Viva)
- Princess Theodora Von Liechtenstein, Ellie Crisp (Green Teen Team)
- Stefano Canessa (Ghent University)

Capitolo 1: Assegnazione geografica tramite STR di individui confiscati di origine ignota

1.1 Introduzione

Il prelievo eccessivo e il commercio illegale delle specie selvatiche ai fini del consumo alimentare o ricreativo sono tra le principali minacce alla biodiversità (Ogden and Linacre 2015), e attualmente i rettili rappresentano la seconda classe di vertebrati più colpiti, dopo gli uccelli (Bush et al. 2014; Auliya et al. 2016).

L'Unione Europea (UE) è il principale importatore mondiale di rettili vivi per il commercio di animali domestici (valutato in 7 milioni di euro nel 2005) (Engler and Parry-Jones 2007). A causa di questo fenomeno, un numero significativo di popolazioni di rettili è già stato gravemente decimato (ad es. Klemens and Moll 1995; Ariano-Sánchez and Torres-Almazán 2010; Horne et al. 2011; Flecks et al. 2012). Il prelievo intenzionale è considerato la seconda più grande minaccia alla sopravvivenza di molte specie di rettili (Böhm et al. 2013) e, di conseguenza, il commercio di rettili domestici ha iniziato ad essere fortemente controllato dalla CITES.

La riallocazione di individui confiscati (perché detenuti o importati illegalmente) implica l'identificazione delle loro aree di origine corrette. Questo è stato per lungo tempo un compito impegnativo in assenza di differenze morfologiche tra le popolazioni naturali e la conseguente disponibilità di semplici tratti diagnostici (Ogden and Linacre 2015). Tuttavia, la tipizzazione del DNA e gli strumenti genetici forensi forniscono ora approcci semplici e sempre più utilizzati per questo scopo, consentendo anche l'identificazione di ibridi.

L'uso di questi strumenti genetici forensi per la fauna selvatica implica la raccolta di informazioni sulla genetica delle popolazioni in un singolo quadro analitico, come la valutazione della variazione genetica e la struttura delle popolazioni a livello geografico.

A parte le ovvie conseguenze di rilasci di individui non nativi sulla consistenza e sulla diversità genetica delle popolazioni naturali locali, il commercio di animali domestici può innescare diversi processi che rappresentano ulteriori minacce alla fauna selvatica:

- ibridazione tra individui nativi e rilasciati (Allendorf et al. 2001; Fong and Chen 2010);
- introduzione di parassiti e agenti patogeni esotici (Young et al. 2017);

- squilibrio dell'ecosistema (Strauss et al. 2006; Vilà et al. 2010);
- nuove invasioni biologiche (Masin et al. 2014; Hulme 2015).

Pertanto, limitare il prelievo all'interno delle aree di origine e ricollocare correttamente gli individui confiscati sono attività della massima importanza (IUCN 2000).

Le testuggini terrestri dell'area mediterranea sono state ampiamente minacciate dal commercio di animali domestici, specialmente nei Balcani (Lambert 1979; Auliya 2003; Pérez et al. 2004; Türkozan et al. 2008; Cox and Temple 2009), come già accennato nell'Introduzione di questa tesi, i paesi dell'ex-Jugoslavia hanno giocato un ruolo importante nelle esportazioni di tartarughe durante il secolo scorso (Honegger 1974; Ljubisavljević et al. 2011). Secondo il Federal Statistical Office, un totale di 2.615 tonnellate di tartarughe sono state esportate dall'ex Jugoslavia in un periodo di 41 anni nel corso del 20° secolo, approssimamene 2 milioni di individui commerciati (Ljubisavljević et al. 2011).

La testuggine di Hermann in particolare è stata particolarmente colpita da questo commercio (Bertolero et al. 2011). Il prelievo intensivo per il commercio di animali domestici, soprattutto prima degli anni '80, quando questo non era ancora vietato (Ljubisavljević et al. 2011), e le liberazioni di individui non nativi in popolazioni locali, sono minacce riconosciute da tempo per questa specie (Bertolero et al. 2011), insieme alla riduzione dell'habitat (Stubbs et al. 1985). Di conseguenza, *T. hermanni* è stata inclusa nella lista delle specie faunistiche rigorosamente protette dalla *Bern Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitat*, e la sottospecie occidentale, *T. h. hermanni*, classificata come *Endangered* dalla Lista Rossa IUCN (*European Reptile & Amphibian Specialist Group 1996*). Tuttavia, l'origine e il destino di individui traslocati illegalmente sono ancora scarsamente indagate in vaste porzioni dell'areale della specie.

In questo lavoro abbiamo testato un pannello di marcatori STR al fine di indagare pattern di traslocazioni illegali in *T. hermanni*, analizzando la provenienza geografica di un ampio campione di individui nei centri di recupero e di sequestro in Italia. A tal fine, abbiamo prima di tutto migliorato le precedenti valutazioni sulla struttura genetica delle popolazioni selvatiche (Perez et al. 2014), con nuovi dati provenienti da aree geografiche precedentemente non campionate. Successivamente, abbiamo utilizzato le informazioni ottenute da analisi di clustering bayesiano per assegnare gli individui confiscati alla più probabile area geografica di origine.

1.2 Materiali e Metodi

1.2.1 Campionamento e metodi di laboratorio

Grazie alla collaborazione con i colleghi dell'Università di Firenze e Perugia, sono stati raccolti 154 campioni di sangue da individui selvatici di *Testudo hermanni* provenienti da Italia continentale, Sicilia, Sardegna, Corsica e Lampedusa e 458 campioni di sangue prelevati da testuggini confiscate tenute in cattività dalle autorità locali (es. Carabinieri Forestali) o da organizzazioni non governative per la conservazione degli animali.

I siti di campionamento di individui selvatici e la posizione dei centri di recupero sono mostrati in fig. 2 e 3, rispettivamente. Campioni di sangue sono stati prelevati dal plesso venoso sub carapaciale o dalla vena coccigea e circa 75 µl sono stati collezionati su FTA® Classic Cards (Whatman™, GE Healthcare) e mantenuti a temperatura ambiente. In alternativa, il sangue prelevato (100 µl - 1 ml) veniva trattato con K3-EDTA e conservato a -20 °C.

Il DNA è stato estratto dalle FTA Cards e dal sangue in EDTA utilizzando una soluzione di Chelex® 100 Resina al 5% (Bio-Rad, Walsh et al. 1991; vedi Appendice). Inizialmente, tutti gli individui erano genotipizzati a 9 loci microsatelliti (Test10, Test56, Test71, Test76, Test88, Gal136, Gal75, Gal73 e Gal263) seguendo il lavoro di Perez et al. (2014) (vedi anche Ciofi et al. 2002; Forlani et al. 2005). Tuttavia, due loci (Test88 e Gal73) hanno prodotto reazioni incoerenti e sono stati scartati per le analisi successive. I protocolli dettagliati sono in Appendice. Al fine di combinare il nostro dataset con quello di Perez et al. (2014) evitando errori di tipizzazione degli alleli, abbiamo ri-genotipizzato i campioni selezionati da (Perez et al. 2014) e abbiamo ricalibrato il binning set e la nomenclatura degli alleli in modo che corrispondessero al loro dataset. La fragment analysis dei prodotti PCR è stata eseguita da MacroGen Inc. su un ABI 3730xl Genetic Analyser (Applied Biosystems) con una size standard di 400HD. L'allele calling è stata eseguita con GENEMAPPER® 4.1 controllando gli elettroferogrammi. Tutti gli elettroferogrammi sono stati valutati da due persone e solo i genotipi multilocus concordanti sono stati mantenuti per analisi successive.

1.2.2 Struttura genetica e database di reference

Come primo passo per valutare l'area di origine degli individui confiscati, è stata condotta un'analisi della struttura della popolazione di individui che possono essere considerati come appartenenti a popolazioni naturali, al fine di definire possibili popolazioni di origine e

formare un database di reference di individui che appartengono effettivamente a ciascuna popolazione identificata.

I genotipi multiloci delle 154 testuggini selvatiche campionate sono stati uniti al dataset di Perez et al. (2014), escludendo da quest'ultimo tutti gli individui che sono stati identificati come migranti o ibridi di 1° e 2° generazione, e la popolazione mista di Bosco Nordio. Il dataset di individui selvatici complessivo era così composto da 461 individui (Tab. 1) (Fig. 2).

Tabella 1. Provenienza e numerosità per luogo di campionamento degli individui appartenenti al dataset *wild* utilizzati per le analisi genetiche.

Nazione	Area	Numero campioni
Grecia	Meteore	9
Grecia	Epanomi	31
Grecia	Aliki	23
Grecia	Kerkini	14
Macedoni	Lago di Prespa	10
Croazia	Vodnjan	4
Italia	Emilia-Romagna	43
Italia	Toscana Nord	5
Italia	Toscana Sud	12
Italia	Lazio Nord	9
Italia	Lazio Centro	16
Italia	Lazio Sud	5
Italia	Campania Nord	6
Italia	Abruzzo	21
Italia	Molise	9
Italia	Puglia Nord	17
Italia	Campania Centro	1
Italia	Puglia Sud	5
Italia	Calabria Nord	13
Italia	Calabria Centro-Nord	31
Italia	Calabria Centro-Sud	4
Italia	Calabria Sud	3
Italia	Sicilia	22
Italia	Lampedusa	2
Italia	Sardegna	24
Francia	Corsica	30
Spagna	Ebro	9
Francia	Var	83
TOTALE		461

È stata eseguita un'analisi di clustering sul dataset *wild* utilizzando il metodo bayesiano implementato in STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000). Le analisi sono state condotte scegliendo un modello con admixture, frequenze alleliche non correlate e una non-uniform ancestry prior ALPHA tra i cluster, come suggerito da Wang (2017) per campionamenti irregolari (numero di campioni per popolazione sbilanciato). Sono state eseguite 20 repliche per ogni valore di K da K = 1 a K = 12 con 750000 MCMC dopo un burnin di 500000. I risultati di STRUCTURE sono stati riepilogati e visualizzati con il server online CLUMPAK (Kopelman et al. 2015). Abbiamo usato STRUCTURE HARVESTER (Earl and vonHoldt 2012) per dedurre il miglior valore di K, basato sia sul ΔK (Evanno et al. 2005) che sulla probabilità $[X|K]$ (Pritchard et al. 2000).

Il database di reference degli individui *wild* è stato quindi preparato sulla base della seguente analisi in tre fasi. Innanzitutto, abbiamo aggiunto a ciascun individuo selvatico le informazioni preliminari sul cluster genetico più rappresentato nell'area geografica da cui sono stati campionati. In secondo luogo, è stato eseguito nuovamente STRUCTURE per identificare migranti e ibridi, utilizzando gli stessi parametri di cui sopra ma fissando K al suo valore ottimale (vedi Risultati) e attivando l'opzione USEPOPINFO (informazione a priori sulla popolazione di provenienza). Infine, tutti gli individui risultati significativamente "non puri" nella rispettiva area geografica sono stati esclusi dal database di riferimento.

1.2.3 Assegnazione di individui di origine sconosciuta

Secondo Manel et al. (2002) i metodi di assegnazione fully Bayesian, implementati in STRUCTURE, performano meglio di quelli partially Bayesian (Cornuet et al. 1999) con tassi di assegnazione più elevati e un errore di assegnazione inferiore. Tuttavia, questo metodo considera tutte le popolazioni contemporaneamente con l'inconveniente di assegnare individui a una popolazione di riferimento anche se la vera popolazione di origine non è effettivamente campionata (Manel et al. 2002). Per superare questo problema, Manel et al. (2002) suggerisce di eseguire sia test di assegnazione bayesiani che test di esclusione.

È stato svolto, sui 458 individui confiscati, un test di assegnazione con STRUCTURE utilizzando l'opzione POPFLAG per gli individui appartenenti alla reference. Inoltre è stato scelto un modello senza admixture. Altri parametri utilizzati erano gli stessi usati in precedenza con USEPOPINFO. Abbiamo assegnato individui a una popolazione di origine

quando la probabilità di un individuo di appartenere a quella popolazione era superiore all'80%.

I test di esclusione sono stati eseguiti con il metodo di esclusione parzialmente bayesiano (Rannala and Mountain 1997) implementato in GENECLASS2 (Piry et al. 2004). Abbiamo confrontato genotipi osservati di individui confiscati con una distribuzione di probabilità prevista di genotipi generati per ciascuna popolazione di riferimento simulando 1000000 individui con un Monte Carlo resampling (Paetkau et al. 2004). Abbiamo escluso le popolazioni di reference come la probabile origine di un individuo quando i valori di probabilità erano inferiori a 0,01.

1.3 Risultati

L'analisi di clustering del dataset *wild* completo indicava che $K = 2$ e $K = 6$ erano i K più supportati. La probabilità logaritmica dei dati aumentava bruscamente da $K = 1$ a $K = 2$ e poi più lentamente da $K = 3$ a $K = 6$ dove raggiungeva un plateau (Fig. 1). Il delta K mostrava due mode. La più grande a $K = 2$, che discriminava la sottospecie orientale e quella occidentale (Fig. 1). La seconda moda a $K = 6$ suggeriva una suddivisione di *T. h. hermanni* e *T. h. boettgeri* in 4 e 2 gruppi, rispettivamente (Fig. 2).

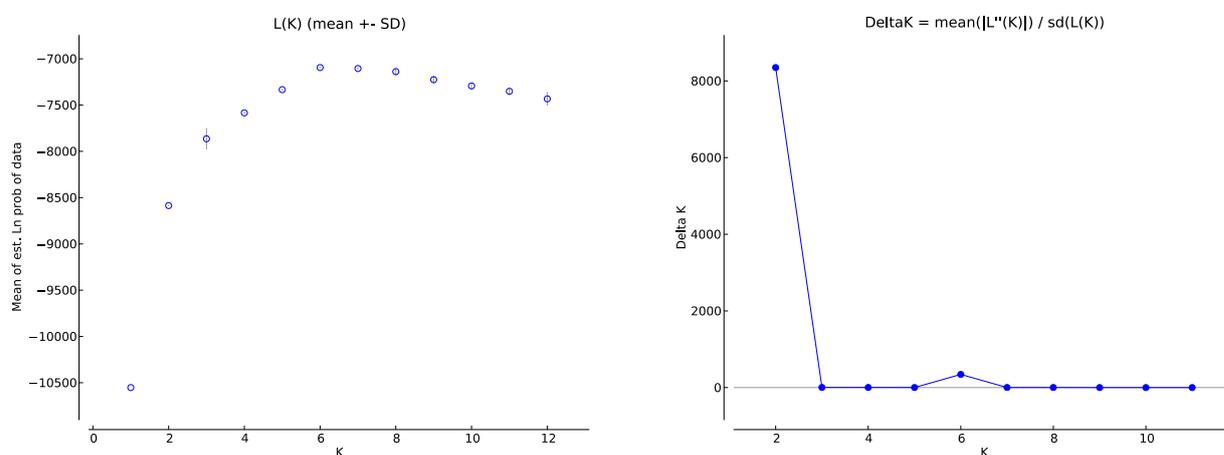


Figura 1. Numero di clusters più probabile (K) per i campioni di *Testudo hermanni* provenienti dalle 28 località di campionamento utilizzando STRUCTURE HARVESTER (Earl and vonHoldt 2012). La probabilità logaritmica (grafico a sinistra) come descritto da Pritchard et al. (2000) e il delta K (grafico a destra) di Evanno et al. (2005).

In *T. h. boettgeri* le macroaree riconosciute erano la Grecia (GRE) e Bosco Mesola con la Croazia e la Macedonia (MCM). In *T. h. hermanni* erano la penisola italiana (ITP) (tutte le popolazioni della penisola italiana centro-meridionale, eccetto i campioni provenienti dalla

Calabria centrale e meridionale), la Francia continentale (FRA), la Calabria (CAL) e le isole del Mediterraneo (Sicilia, Sardegna, Corsica, Pantelleria) insieme con la Spagna (ISS). Questi risultati concordano con i gruppi precedentemente ottenuti da Perez et al. (2014), ma con il cluster CAL aggiuntivo emerso da un'area precedentemente non campionata.

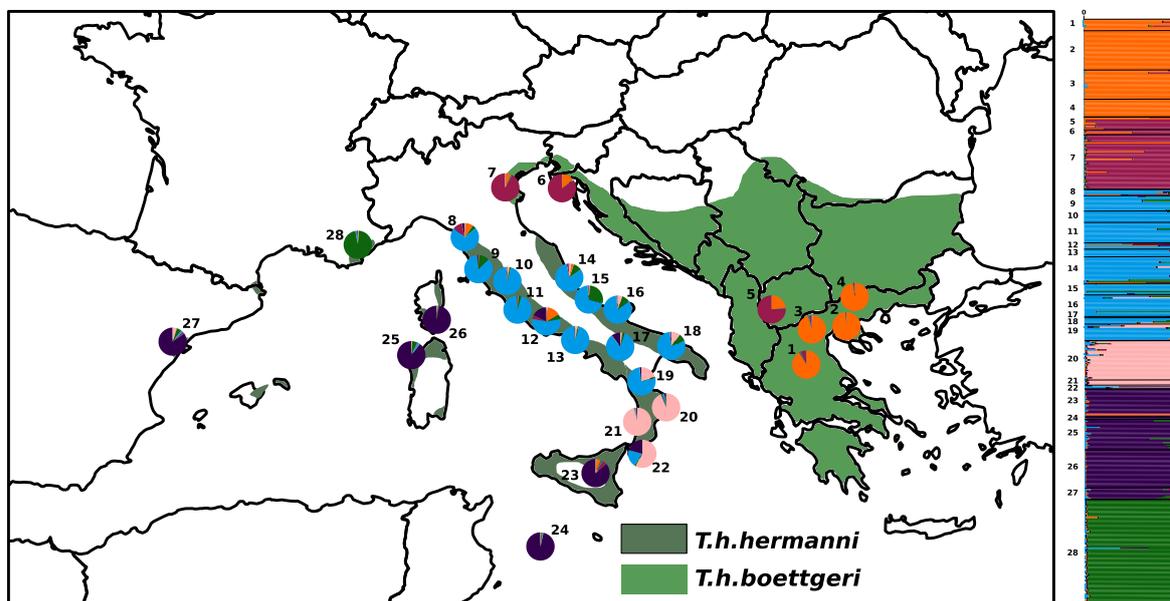


Figura 2. Struttura genetica di popolazioni selvatiche di *T. hermanni* stimate utilizzando STRUCTURE. Il dataset *wild* è composto dall'integrazione di campioni raccolti in questo studio e individui provenienti da Perez et al. (2014). Le località di campionamento e il numero di individui campionati per sito (N) del dataset integrato sono i seguenti: 1-Meteore [Grecia] (N=9), 2-Epanomi [Grecia] (N=31), 3-Aliki [Grecia] (N=23), 4-Kerkini [Grecia] (N=14), 5-Prespa Lake [Macedonia] (N=10), 6-Vodnjan [Croazia] (N=4), 7-Emilia-Romagna (N=43), 8-Toscana Nord (N=5), 9-Toscana Sud (N=12), 10-Lazio Nord (N=9), 11-Lazio Centro (N=16), 12-Lazio Sud (N=5), 13-Campania Nord (N=6), 14-Abruzzo (N=21), 15-Molise (N=9), 16-Puglia Nord (N=17), 17-Campania Centro (N=1), 18-Puglia Sud (N=5), 19-Calabria Nord (N=13), 20-Calabria Centro-Nord (N=31), 21-Calabria Centro-Sud (N=4), Calabria Sud (N=3), 23-Sicilia (N=22), 24-Lampedusa (N=2), 25-Sardegna (N=24), 26-Corsica (N=30), 27-Ebro [Spagna] (N=9), 28-Var [Francia] (N=83). In corsivo i siti nuovi campionati o dove è stata incrementata la dimensione del campione (Perez et al. 2014).

Le analisi condotte con STRUCTURE, utilizzando le informazioni geografiche a priori sulle popolazioni, hanno permesso di rilevare la presenza di un ibrido e sei individui migranti tra le popolazioni selvatiche (Tab. 2).

Tabella 2. Lista di campioni ibridi e migranti trovati tra le popolazioni naturali.

ID campione	Località del campione (Prior Cluster)	Risultato più probabile
77	Bosco Mesola (MCM)	Migrante da GRE
CA5	Camaiore (ITP)	Migrante da MCM
SAB3	Sabaudia (ITP)	Migrante da GRE
6TS	Torino di Sangro (ITP)	Migrante da GRE
RG1	Roggiano Gravina (ITP)	Ibrido ITPxCAL
RI1	Caltanissetta (ISS)	Migrante da MCM
RI2	Caltanissetta (ISS)	Migrante da GRE

Mentre l'unico ibrido proveniva da una zona di admixture tra due gruppi geograficamente contigui e uno dei migranti proveniva dalla stessa sottospecie, gli altri cinque migranti provenivano dall'altra sottospecie (quattro da cluster spazialmente molto distanti). I genotipi di questi sette individui sono stati esclusi dal database di reference delle rispettive popolazioni per le analisi seguenti.

Per assegnare i 458 individui confiscati in Italia alla più probabile area geografica di provenienza, abbiamo usato $K = 6$ come valore K ottimale, e $q > 0.8$ come soglia di assegnazione. Sotto quella soglia potrebbe essere un ibrido. Utilizzando questi valori siamo stati in grado di assegnare oltre il 90% dei campioni a uno dei sei cluster.

I test di esclusione sono stati eseguiti utilizzando $p < 0,01$ come valore soglia. Una volta combinati i risultati dei test di assegnazione ed esclusione per le 458 testuggini di origine ignota, il 38,7% è stato assegnato al cluster ITP, il 14,8% all'MCM, il 6,5% al GRE, il 5,7% all'ISS, il 3,1% al CAL e lo 0,2% al FRA, mentre il 31% degli individui non sono stati assegnati a nessun cluster predefinito (NA).

La maggior parte delle testuggini assegnate apparteneva al cluster genetico corrispondente all'area in cui si trovava il centro di recupero. Tuttavia, abbiamo trovato prove di trasferimenti di individui a lunga distanza, specialmente nei centri di recupero lungo la costa

adriatica e di fronte alle regioni balcaniche, che sono note per essere la fonte di scambi illeciti (vedere Fig. 3).

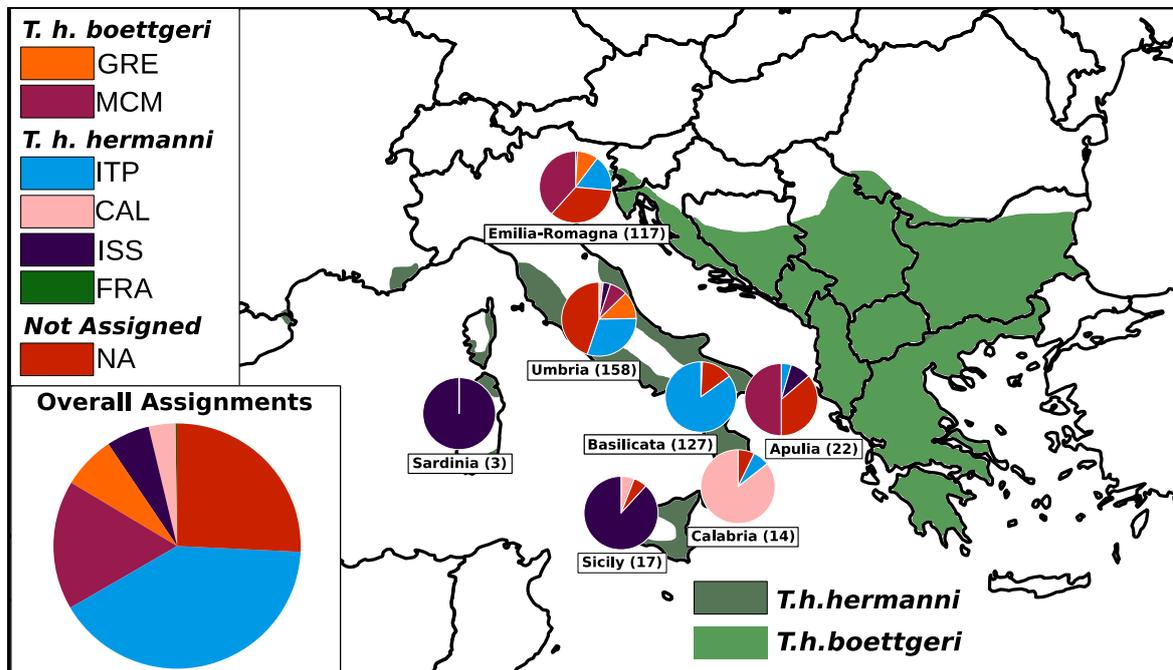


Figura 3. Assegnazione geografica di 458 campioni confiscati, di origine ignota, provenienti da 7 centri di recupero italiani. Assegnazioni generali sono mostrate nella torta in basso a sinistra della figura. Assegnazioni locali per ogni centro di recupero sono mostrate nelle torte localizzate sulla mappa (tra parentesi il numero di individui). GRE = Grecia; MCM = Bosco Mesola, Croazia e Macedonia; ITP = Italia Peninsulare; CAL = Calabria; ISS = Isole Mediterranee e Spagna; FRA = Francia; NA = campioni non assegnati.

In Puglia, ad esempio, solo uno dei 14 individui assegnati apparteneva al cluster genetico locale ITP, mentre undici di essi erano classificati come MCM. Nel centro di recupero in Emilia-Romagna, il 60% degli individui assegnati erano probabilmente locali o importati dalle aree balcaniche geneticamente molto simili (il cluster *Testudo hermanni boettgeri* MCM). Ma circa il 25% e il 14% di essi erano classificati come importati dalla Grecia (GRE) o classificati all'interno del cluster ITP *Testudo hermanni hermanni*, rispettivamente. Nel centro di recupero in Umbria, oltre il 20% dei campioni assegnati aveva origini greche. D'altra parte, quando la piccola percentuale di campioni non assegnati veniva esclusa, oltre il 90% degli individui in cattività dalle aree occidentali e meridionali (Basilicata, Calabria, Sicilia e Sardegna) apparteneva al cluster locale.

1.4 Discussione

Lo scopo principale di questo lavoro era testare un piccolo pannello di marcatori microsatelliti potenzialmente utile come strumento per identificare l'origine geografica più probabile di testuggini terrestri, *T. hermanni*, e applicarlo a individui di origine sconosciuta attualmente ospitati nei centri di sequestro e recupero italiani. Abbiamo dimostrato come questo strumento è in grado di assegnare una grande percentuale di individui a specifiche macro-regioni, contribuendo così a progetti di rilascio in natura di animali in cattività.

I risultati generali dei test di assegnazione mostrano che la maggior parte degli individui assegnati erano originari della penisola italiana (cluster ITP e CAL) o di cluster che rientrano almeno parzialmente all'interno dei confini nazionali (cluster ISS e MCM). Un significativo 6,5% degli esemplari ospitati nei centri italiani proveniva dalla Grecia, con evidenza di traslocazioni a lunga distanza, mentre solo un individuo è stato assegnato al cluster genetico francese. Queste percentuali, tuttavia, variano ampiamente tra i centri, con alcuni di essi che ospitano un numero significativo di individui non locali.

Abbiamo inoltre trovato un 31% di individui in cattività che non è stato possibile assegnare. Questo potrebbe essere spiegato alla luce di tre considerazioni principali. Innanzitutto, le popolazioni di origine, degli individui non assegnati, potrebbero non essere state campionate. Contrariamente al metodo di assegnazione di STRUCTURE, il metodo di esclusione di GENECLASS2 è più conservativo e non assegna gli individui quando le loro vere popolazioni di origine non sono state campionate. Il nostro ulteriore campionamento delle popolazioni selvatiche ha aumentato la copertura della distribuzione geografica campionaria rispetto allo studio precedente (Perez et al. 2014), principalmente nelle popolazioni italiane della sottospecie *T. h. hermanni*. Grandi aree al di fuori di questo range rimangono scarsamente campionate, specialmente lungo la penisola balcanica, quindi è possibile che ulteriori campioni potrebbero portare a un miglioramento in futuro delle percentuali di assegnazione. In secondo luogo, gli individui non assegnati potrebbero essere ibridi, a causa dell'accoppiamento avvenuto in cattività o in natura (dove si possono trovare animali introdotti) tra individui con origini diverse. In questo caso, gli algoritmi di assegnazione falliscono nell'assegnare individui con un'alta probabilità a un cluster specifico. Terzo, diverse popolazioni condividono frazioni rilevanti di variazione genetica, e quindi il potere discriminante di un pannello di sette marcatori microsatellite non può essere molto alto.

Le analisi sulla struttura genetica delle popolazioni selvatiche hanno confermato il pattern generale trovato da Perez et al. (2014), rivelando inoltre un maggior dettaglio dovuto all'incremento della dimensione campionaria. Nonostante l'utilizzo di 7 marcatori microsatellite invece dei 9 usati da Perez et al. (2014), i nostri risultati sono pienamente coerenti con i loro, mostrando 2 principali gruppi genetici corrispondenti alle 2 sottospecie riconosciute e un'ulteriore struttura al loro interno. Il maggior sforzo di campionamento, lungo la penisola italiana, ci ha permesso di riconoscere un ulteriore cluster in Calabria. Questo risultato non è inaspettato, dal momento che questa regione è un ben noto rifugio glaciale e area di hotspot della diversità genetica per molte specie di clima temperato (Canestrelli et al. 2006, 2008, 2010, 2012; Chiochio et al. 2017). Al contrario, l'aumento del numero di campioni sulle isole del Mediterraneo (cioè Sardegna e Lampedusa) ha confermato la presenza di un singolo cluster genetico insulare. Questo potrebbe spiegato con le traslocazioni mediate dall'uomo durante la preistoria e durante l'epoca romana (Vamberger et al. 2011; Perez et al. 2014).

L'analisi preliminare condotta sulle popolazioni naturali ha rivelato la presenza di sei migranti e un ibrido. Mentre l'individuo ibrido rinvenuto nell'area nord della Calabria può essere ragionevolmente considerato come una conseguenza di una zona naturale di admixture tra i cluster peninsulari italiani e quelli calabresi, la presenza di migranti provenienti da aree di origine molto lontane potrebbe essere spiegata da traslocazioni avvenute ad opera dell'uomo.

In particolare, la presenza di individui della sottospecie orientale provenienti dalla Grecia, nelle popolazioni selvatiche della penisola italiana e della Sicilia potrebbero essere una conseguenza dell'ampio commercio di animali domestici che ha colpito questa specie, con centinaia di migliaia di tartarughe raccolte per lo più nell'Europa sud-orientale tra gli anni '60 e '80 e spedite nell'Europa occidentale (Lambert 1979; Swingland and Klemens 1989). Questa evidenza indica chiaramente che la fuga o il rilascio di individui non endemici tra le popolazioni autoctone selvatiche non è così raro, con potenziali implicazioni genetiche ed epidemiologiche.

La preoccupazione prioritaria che ha motivato questo studio e che richiede soluzioni urgenti è la gestione delle testuggini mantenute in cattività nei centri di sequestro e recupero. Questi animali, solitamente confiscati dalle autorità locali o trovati da privati cittadini lontano da popolazioni naturali e probabilmente scappati da contesti domestici, non possono essere rilasciati in natura senza la conoscenza della loro origine. Il loro numero è in aumento, con problemi crescenti legati alla loro gestione e alle condizioni di salute. L'assemblaggio di un

database genetico di reference e la valutazione dell'origine geografica più probabile degli esemplari in cattività sono passi fondamentali verso lo sviluppo di piani di reintroduzione in natura, che non solo ridurranno i problemi e i costi associati agli animali in cattività, ma che aiuteranno a ricreare popolazioni naturali in aree in cui questa specie era presente in passato ma che ora è estinta.

Gli sforzi futuri dovrebbero essere diretti ad ottenere una maggiore risoluzione geografica della struttura genetica delle popolazioni naturali, con conseguente riduzione della percentuale di individui non assegnati.

Questi obiettivi potrebbero essere raggiunti con una o entrambe le seguenti strategie. In primo luogo, campionare aree ancora scarsamente coperte, al fine di ottenere una rappresentazione completa della variazione genetica lungo tutto l'areale della specie. Secondo, aumentare il numero di marcatori genetici informativi, possibilmente diminuendo i costi. Le nuove tecnologie di *Next Generation Sequencing* (NGS) potrebbero aiutare in questa direzione, consentendo di sviluppare un gruppo di SNP diagnostici da valutare con alcuni dei metodi di genotipizzazione sempre più economici (Seeb et al. 2011; Ogden and Linacre 2015) (vedere capitolo 3).

Appendice

Estrazione DNA

FTA-Cards. Un campione di sangue è stato prelevato da una FTA Classic Cards con un punteruolo Harris Uni-Core (1,2 mm), inserito in una provetta da microcentrifuga da 1,5 ml e macerato con un ago. Il campione discale è stato lavato due volte con 1 ml di acqua deionizzata sterile, incubato per 10 minuti e miscelato occasionalmente. I campioni sono stati quindi centrifugati per 3 minuti a 20000 x g, la parte sopranatante è stata rimossa e scartata. Successivamente, 200 μ l di Chelex 100 al 5% sono stati aggiunti al campione e incubati a 56 °C per 20 minuti. I campioni sono stati quindi agitati su vortex per 15 secondi e incubati a 100 °C per 8 minuti. Dopo l'incubazione i campioni sono stati agitati di nuovo su vortex per 15 secondi e centrifugati per 3 minuti a 20000 x g. La parte sopranatante è stata trasferita in una nuova provetta e conservato a -20 °C.

Sangue. 3 ml di sangue sono stati aggiunti a 1 ml di acqua deionizzata sterile in una provetta da 1,5 ml, miscelati e incubati a temperatura ambiente per 15-30 minuti per il lavaggio. I campioni sono stati quindi centrifugati per 3 minuti a 10000 x g. Il sopranatante è stato rimosso e scartato, lasciando circa 20-30 μ l di campione nella provetta. Successivamente, il 5% della sospensione di Chelex è stato aggiunto ai campioni fino a 200 μ l di volume finale e incubato a 56 °C per 20 minuti. I campioni sono stati quindi agitati su vortex per 5 secondi e incubati a 100° C per 8 minuti. Dopo l'incubazione i campioni sono stati agitati di nuovo su vortex per 5 secondi e centrifugati per 3 minuti a 10000 x g. Il sopranatante è stato trasferito in una nuova provetta e conservato a -20 °C.

PCR microsatellite

Test10: il primer forward è stato etichettato con 6-FAM; la miscela di reazione (10 μ l) conteneva 2 μ l di DNA, 0,5 μ M di ciascun primer, 2,5 mM di MgCl₂, 0,2 mM di ciascun dNTP, GoTaq Flexi Buffer 1X e 0,6 U di GoTaq G2 Hot-Start DNA Polymerase (Promega); il ciclo di PCR includeva una denaturazione iniziale a 94 °C per 2 minuti, 35 cicli di 20

secondi a 94 °C, 10 secondi a 53 °C, 20 secondi a 65° C e un'estensione finale a 65 °C per 5 minuti.

Test71: il primer forward è stato etichettato con 6-FAM; la miscela di reazione (10 µl) conteneva 2 µl di DNA, 0,6 µM di ciascun primer, 2,5 mM di MgCl₂, 0,2 mM di ciascun dNTP, GoTaq Flexi Buffer 1X e 0,75 U di GoTaq G2 Hot-Start DNA Polymerase (Promega); il ciclo di PCR includeva una denaturazione iniziale a 94 °C per 2 minuti, 37 cicli di 30 secondi a 94 °C, 1 minuto a 56 °C, 1 minuto a 72 °C e un'estensione finale a 72 °C per 5 minuti.

Gal75: il primer forward è stato etichettato con 6-FAM; la miscela di reazione (10 µl) conteneva 2 µl di DNA, 0,24 µM di ciascun primer, 3 mM di MgCl₂, 0,2 mM di ciascun dNTP, GoTaq Flexi Buffer 1X e 0,6 U di GoTaq G2 Hot-Start DNA Polymerase (Promega); il ciclo di PCR includeva una denaturazione iniziale a 94 °C per 5 minuti, 15 cicli di 30 secondi a 94 °C, 30 secondi a 60 °C (diminuzione della temperatura di annealing di 1 °C ad ogni ciclo), 30 secondi a 72 °C , 20 cicli di 30 secondi a 94 °C, 30 secondi a 45 °C, 30 secondi a 72 °C e un'estensione finale a 72 °C per 7 minuti.

Gal263: il primer forward è stato etichettato con HEX; la miscela di reazione (10 µl) conteneva 2 µl di DNA, 0,5 µM di ciascun primer, 1,5 mM di MgCl₂, 0,2 mM di ciascun dNTP, GoTaq Flexi Buffer 1X e 0,5 U di GoTaq G2 Hot-Start DNA Polymerase (Promega); il ciclo di PCR includeva una denaturazione iniziale a 94 °C per 3 minuti, 35 cicli di 30 secondi a 94 °C, 30 secondi a 50 °C, 30 secondi a 72 °C e un'estensione finale a 72° C per 3 minuti.

Test56: il primer forward è stato etichettato con HEX; la miscela di reazione (10 µl) conteneva 2 µl di DNA, 0,5 µM di ciascun primer, 2,5 mM di MgCl₂, 0,2 mM di ciascun dNTP, GoTaq Flexi Buffer 1X e 0,6 U di GoTaq G2 Hot-Start DNA Polymerase (Promega); il ciclo di PCR includeva una denaturazione iniziale a 94 °C per 2 minuti, 35 cicli di 20 secondi a 94 °C, 10 secondi a 56 °C, 20 secondi a 65 °C e un'estensione finale a 65 °C per 5 minuti.

Test76: il primer forward è stato etichettato con TAMRA; la miscela di reazione (10 µl) conteneva 2 µl di DNA, 0,5 µM di ciascun primer, 2,5 mM di MgCl₂, 0,2 mM di ciascun

dNTP, GoTaq Flexi Buffer 1X e 0,6 U di GoTaq G2 Hot-Start DNA Polymerase (Promega); il ciclo di PCR includeva una denaturazione iniziale a 94 °C per 2 minuti, 35 cicli di 20 secondi a 94 °C, 10 secondi a 58 °C, 20 secondi a 65 °C e un'estensione finale a 65 °C per 5 minuti.

Gal136: il primer forward è stato etichettato con 6-FAM; la miscela di reazione (10 µl) conteneva 2 µl di DNA, 0,24 µM di ciascun primer, 3 mM di MgCl₂, 0,2 mM di ciascun dNTP, GoTaq Flexi Buffer 1X e 0,6 U di GoTaq G2 Hot-Start DNA Polymerase (Promega); il ciclo di PCR includeva una denaturazione iniziale a 94 °C per 5 minuti, 15 cicli di 30 secondi a 94 °C, 30 secondi a 60 °C (diminuzione della temperatura di annealing di 1 °C ad ogni ciclo), 30 secondi a 72 °C, 20 cicli di 30 secondi a 94 °C, 30 secondi a 45 °C, 30 secondi a 72 °C e un'estensione finale a 72 °C per 7 minuti.

I prodotti PCR sono stati assemblati in una multiplex post-PCR: una comprendente Test76, Gal263, Gal75, Test71, Test10 e nell'altra Gal136 e Test56.

Capitolo 2: Analisi genetiche di testuggini terrestri con fenotipo *hercegovinensis* provenienti da allevamento

2.1 Introduzione

All'interno della controversa situazione riguardante lo status tassonomico delle diverse popolazioni di *T. h. boettgeri*, si inserisce il caso della *Testudo hercegovinensis* (o *Testudo hermanni hercegovinensis*), la cui classificazione è ancora oggi causa di dibattito tra tassonomi, erpetologi ed allevatori. Le popolazioni che vengono identificate in questo presunto nuovo *taxon*, sono endemiche della Croazia, della Bosnia e del Montenegro e furono descritte per la prima volta da Werner nel 1899, come sottospecie di *Testudo graeca*; successivamente sono state accorpate alla sottospecie *T. h. boettgeri* fino alla loro recente rivalutazione da parte di Perälä (2002b) che ha proposto di elevare questo gruppo di popolazioni a rango di specie. In effetti le popolazioni della costa adriatica della penisola balcanica, mostrano caratteri morfologici peculiari che, secondo Perälä, giustificherebbero la loro separazione dalla sottospecie *T. h. boettgeri*. Innanzitutto, *T. h. hercegovinensis* è di dimensioni più contenute, i maschi non superano i 148 mm e le femmine possono misurare al massimo 190 mm. Le dimensioni medie sono attorno ai 126-135 mm per un peso di 600-830 grammi negli esemplari maschi e attorno a 140-150 mm per un peso di 990-1080 grammi nelle femmine. La colorazione del piastrone risulta più scura rispetto a quella che abitualmente si osserva in *T. h. boettgeri* e in alcuni esemplari le macchie scure formano due bande quasi continue, caratteristica che le rende più simili morfologicamente alla sottospecie occidentale *T. h. hermanni* (Fig. 1). Il rapporto fra la sutura pettorale e la sutura femorale è invece più vicino a quello tipico della sottospecie orientale anche se le misurazioni non sono avvenute su un campione sufficientemente ampio e quindi non statisticamente significativo. Dall'analisi degli esemplari originali depositati da Werner, pare che il rapporto tra le suture sia prossimo a 1 (Fig. 1) e ciò rientra nello standard riconosciuto in *T. h. boettgeri*, infatti nel 1968 Stemmler individuò in un valore attorno a 0,85 il rapporto fra sutura pettorale e sutura femorale nella sottospecie orientale (contro 1,8 per quella occidentale). Osservando il lato ventrale degli esemplari di *T. h. hercegovinensis*, il settimo scuto marginale risulta meno proteso verso l'incavo nel quale vengono ritirate le zampe posteriori. Un ulteriore carattere riscontrato in molti, ma non in tutti gli individui di questa popolazione, è la forma dello sperone (buttress) inguinale posteriore che può essere fortemente biforcuto dorsalmente; tale carattere, sempre secondo Perälä, non sarebbe stato rilevato in nessun'altra

popolazione del genere *Testudo*. Ma il carattere che viene indicato da Perälä come fattore chiave nella descrizione della sottospecie *T. h. hercegovinensis* è rappresentato dall'assenza delle scaglie inguinali (osservabili nelle cavità del carapace nelle quali vengono ritirate le zampe posteriori) (Fig. 2). Tuttavia la validità di tale carattere diagnostico è stata messa in discussione da molti biologi, in quanto da solo non è affatto determinante per ascrivere un esemplare a tale possibile sottospecie; sono infatti stati trovati molti esemplari in cui è presente anche una sola scaglia inguinale, dal lato destro o da quello sinistro, e ciò non sembra pregiudicare la corretta attribuzione alla sottospecie '*hercegovinensis*' (Fritz et al. 2006). Questo carattere è ancora oggi oggetto di discussioni e non viene accettato da tutti; infatti, mentre l'assenza di una o di entrambe le scaglie inguinali pare escludere l'appartenenza a *T. h. boettgeri*, la presenza delle stesse (entrambe o solo una) non sarebbe motivo sufficiente per ascrivere l'esemplare a questa stessa sottospecie ed escludere che si tratti di una '*hercegovinensis*'.

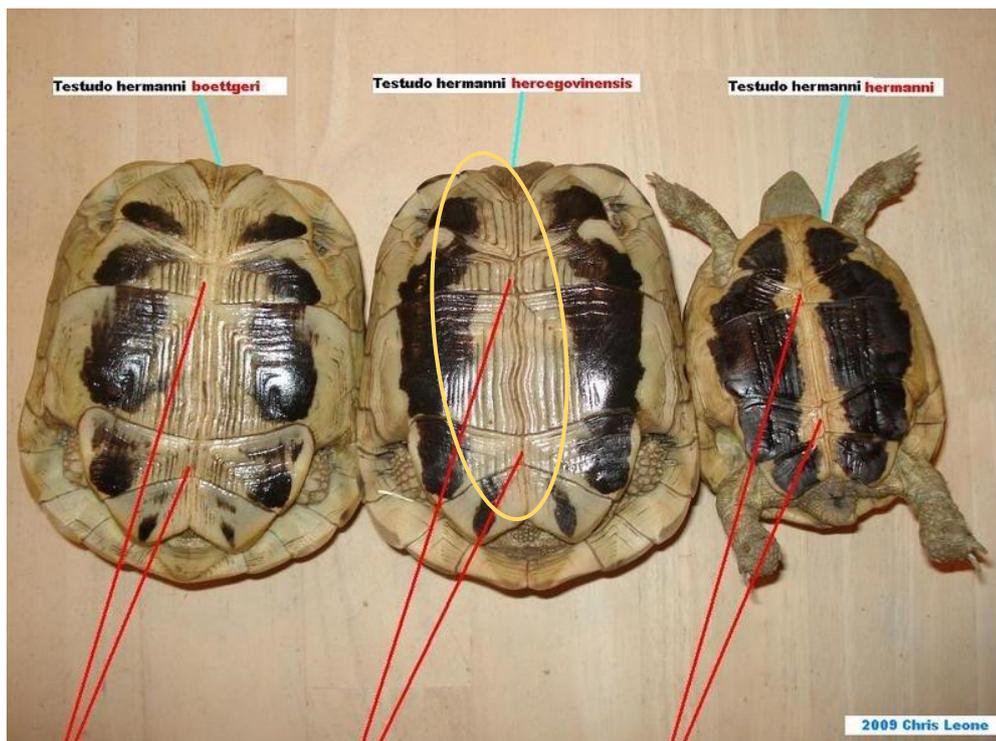


Figura 1. In giallo: le macchie scure sul piastrone di *T. h. hercegovinensis* (centro) sono più scure e uniformi di quelle di *T. h. boettgeri*. In rosso: Rapporto nelle dimensioni delle suture pettorali e femorali in *T. h. boettgeri* (sinistra), *T. h. hercegovinensis* (centro) e *T. h. hermanni* (destra); notare come tale rapporto sia più vicino a 1 in *T. h. hercegovinensis*. (www.hermannihaven.com)

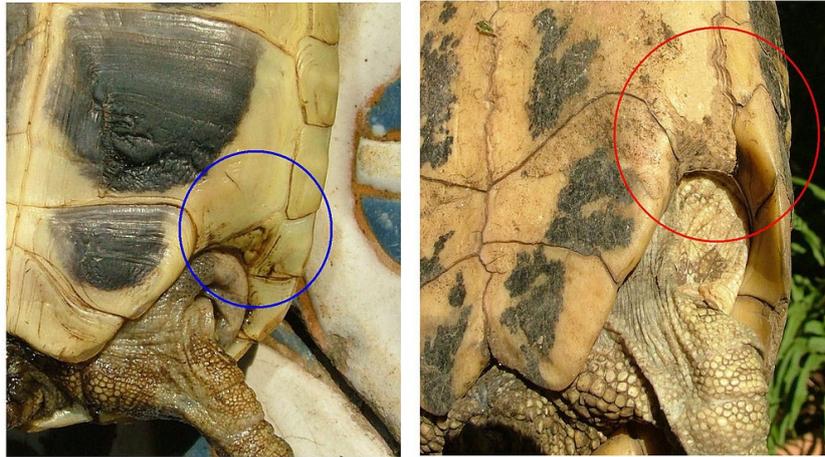


Figura 2. A destra esemplare di *T. h. boettgeri* con scaglia inguinale, A sinistra esemplare di *T. h. hercegovinensis* in cui manca la scaglia inguinale. (www.hermannihaven.com)

Ulteriori differenze sono state osservate nel comportamento riproduttivo di esemplari in cattività; *T. h. hercegovinensis* depone generalmente una sola volta a stagione, da un minimo di 3 a un massimo di 5 uova per covata. *T. h. boettgeri* depone invece anche 3 volte durante l'estate e la quantità di uova per covata supera quasi sempre il numero di 5 (Stancher in www.tartaclubitalia.it). Altri allevatori hanno rilevato una differenza nei tempi di schiusa delle uova: 54 giorni per *T. h. hercegovinensis* contro i 70 giorni di *T. h. boettgeri* (Bellavista, comunicazione personale).

Le difficoltà nel trovare un accordo sulla collocazione tassonomica di tali popolazioni sono quindi giustificate dal fatto che ci si trova di fronte ad un continuum di forme che rende difficile porre dei confini netti entro i quali caratterizzare univocamente le diverse sottospecie (Fig. 3).

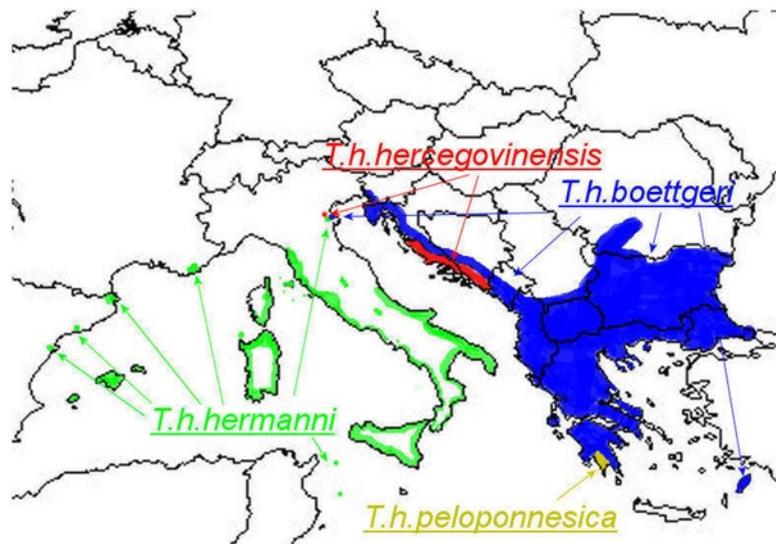


Figura 3. Areale delle sottospecie ufficiali (*T. h. hermanni*, *T. h. boettgeri*) e proposte (*T. h. hercegovinensis*, *T. h. peloponnesica*) di *Testudo hermanni*. (Wikipedia)

La collocazione sistematica delle popolazioni appartenenti a specie in pericolo è di fondamentale importanza e rappresenta uno degli scogli maggiori in uno studio di genetica della conservazione; l'esatta identificazione tassonomica di una popolazione è cruciale nell'ambito della biologia di conservazione, infatti in base ad essa vengono definite le diverse unità di gestione e adottate le adeguate misure per la conservazione.

Il presente lavoro è proprio indirizzato a indagare tramite marcatori molecolari (microsatelliti e un gene mitocondriale) la collocazione filogenetica e tassonomica di 14 esemplari dell'ipotetica sottospecie *T. h. hercegovinensis* (o specie *Testudo hercegovinensis*). Questi campioni si trovano attualmente nell'allevamento "Testudoalbino" di proprietà del dottor Maurizio Bellavista ad Arezzo, ma sono stati prelevati da siti naturali nei Balcani, molto probabilmente lungo la costa adriatica. Queste testuggini fanno parte di un pool di individui che vengono venduti come *Testudo hercegovinensis* (www.testudoalbino.com).

In particolare, lo studio prevede:

- una ricerca bibliografica sulla storia dello status tassonomico di *Testudo hercegovinensis*;
- la genotipizzazione degli individui tramite analisi di marker genetici quali il gene mitocondriale 12S rRNA e 7 loci microsatelliti;
- la ricostruzione dell'origine degli animali tipizzati (popolazione di appartenenza) attraverso analisi statistiche (test di assegnazione ed esclusione, e analisi fattoriale).

2.2 Materiali e Metodi

2.2.1 Campionamento

I campioni analizzati in questo lavoro provengono dall'allevamento Testudoalbino (www.testudoalbino.com) di proprietà del dottor Maurizio Bellavista, ad Arezzo. I 14 esemplari di *Testudo hermanni* furono precedentemente acquistati dall'allevamento Farm Dular (www.facebook.com/farm.dular) in Jesenice, Slovenia. Molto probabilmente queste testuggini sono state prelevate da siti naturali lungo la costa adriatica della penisola balcanica, considerando il fenotipo e le dichiarazioni degli allevatori.

I campionamenti sono stati effettuati in data 17 luglio 2017 nell'allevamento Testudoalbino. Per ogni individuo è stato prelevato un campione di sangue di circa 1,5 ml dal plesso venoso caudale. I campioni ottenuti sono stati raccolti in provette contenenti l'anticoagulante K2-EDTA e conservate alla temperatura di -20 °C.

Di seguito sono riportate le fotografie di alcuni dei 14 campioni dello studio (Fig. 4); si può notare come queste testuggini manifestino i tratti fenotipici che caratterizzano la forma “*hercegovinensis*”: le macchie del piastrone sono più marcate e continue rispetto a quelle tipiche di *T. h. boettgeri* (Fig. 4a), il rapporto tra sutura pettorale e femorale è molto vicino a 1 (Fig. 4b), il colore del carapace è più contrastato (Fig. 4c), nessuno dei 14 esemplari possiede le scaglie inguinali (Fig. 4d).

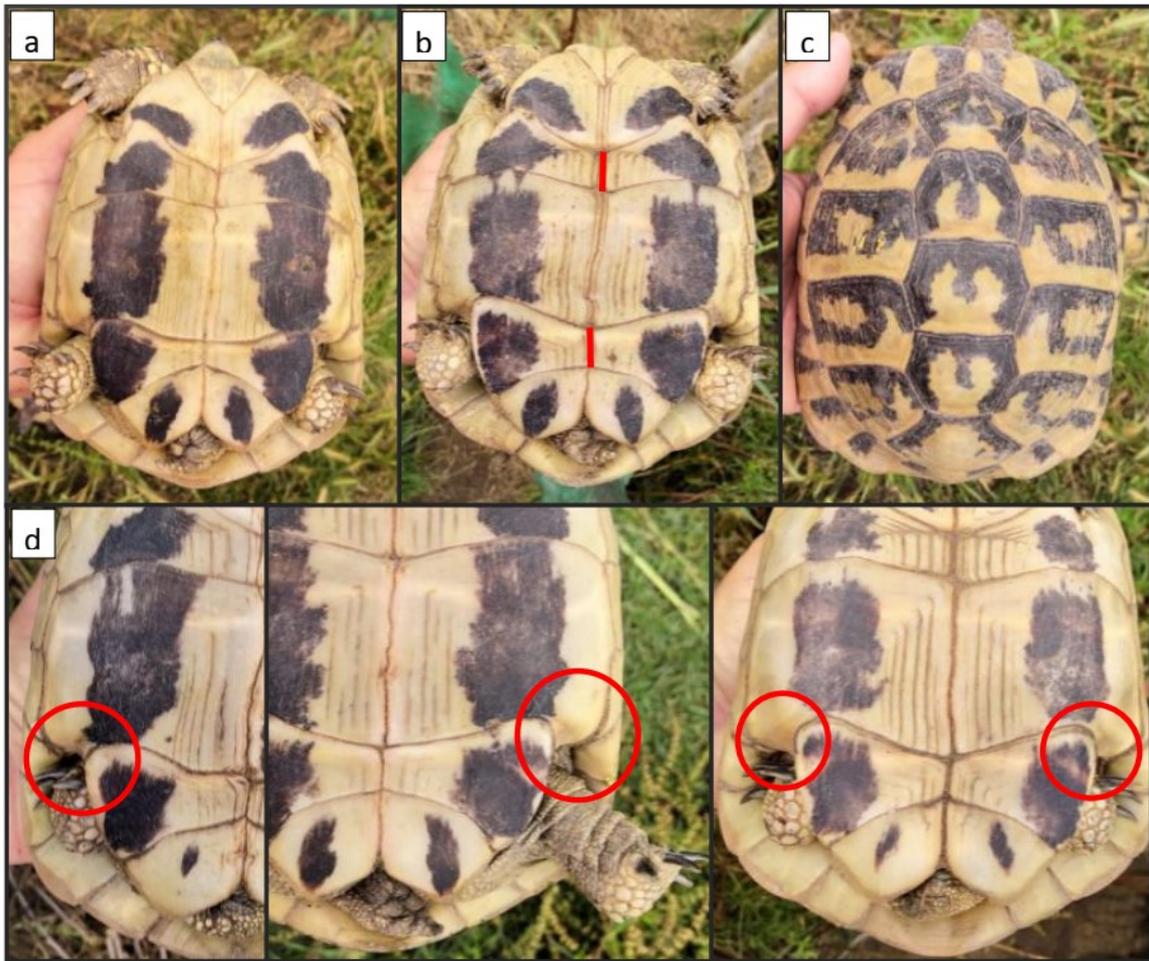


Figura 4. Immagini di alcuni dei 14 campioni dello studio; a) macchie scure e piuttosto continue del piastrone, b) rapporto sutura pettorale/femorale vicino a 1, c) colorazione contrastata del carapace d) assenza di scaglie inguinali. (www.hermannihaven.com)

2.2.3 Analisi molecolari

L'estrazione del DNA genomico totale è avvenuta seguendo il protocollo riportato nelle istruzioni del DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).

2.2.3.1 DNA mitocondriale

In questo lavoro è stato scelto di analizzare il gene per la subunità 12S del RNA ribosomiale (12S rRNA) del genoma mitocondriale, in quanto rappresenta un marker filogeneticamente informativo già utilizzato in precedenti studi, allo scopo di analizzare la diversità genetica inter- e intra-popolazione di *Testudo hermanni* (Mirimin et al. 2004; Perez et al. 2014). Tramite PCR sono stati amplificati 395 nucleotidi del gene 12S rRNA, usando i primers L1091 e H1478 (Kocher et al. 1989). I prodotti della PCR sono stati purificati per rimuovere i primer e i dNTPs in eccesso, e successivamente sequenziati mediante sequenziatore automatico a 96 capillari presso i laboratori della ditta tedesca Starseq.

2.2.3.2 Loci microsatelliti

In aggiunta al gene mitocondriale 12S rRNA, sono stati analizzati 7 loci microsatelliti allo scopo di aumentare i dati a nostra disposizione e ottenere una risoluzione maggiore nell'analisi della diversità genetica a livello di sottospecie. I loci analizzati sono i seguenti: TEST10, TEST56, TEST71, TEST76, GAL75, GAL136, GAL263; tali loci sono stati usati in precedenti studi per la genotipizzazione di popolazioni di *T. hermanni* (vedi Capitolo 1; Perez et al. 2014).

I diversi loci STR sono stati amplificati tramite PCR utilizzando primer specifici e profili termici adeguati. Dopo l'amplificazione, i diversi loci sono stati divisi in due multiplex di caricamento, in modo da poter caricare tutte le amplificazioni di ogni campione nello stesso pozzetto e ottimizzare così tempo e reagenti della reazione di sequenziamento.

L'elettroforesi capillare dei prodotti di PCR è avvenuta tramite sequenziatore a 96 pozzetti presso i laboratori della Macrogen (Corea del Sud).

Tutti i protocolli utilizzati in laboratorio sono descritti in dettaglio nell'Appendice del Capitolo 1.

2.2.4 Analisi statistiche dei dati

2.2.4.1. DNA mitocondriale

Le sequenze ottenute dal frammento di 395 bp del gene 12S rRNA sono state sottoposte a controllo ed editing (lettura elettroferogramma, eliminazione delle estremità di scarsa qualità, controllo di siti SNPs) utilizzando il software BioEdit (Hall 1999). Dopo il filtering la risultante lunghezza del marker era di 296 bp. Successivamente le sequenze del gene 12S, dei 14 campioni in esame, sono state allineate con il software MEGA7 (Kumar et al. 2016) che implementa il programma ClustalW (Thompson et al. 1994), specifico per l'allineamento multiplo di sequenze, ad un dataset di riferimento di 404 individui di *T. hermanni*, tipizzate allo stesso marcatore in studi precedenti (Mirim 2004, Perez 2014).

Tramite il software MEGA7 le sequenze in formato *fasta* sono state convertite nel formato NEXUS per permettere l'analisi tramite il software PopArt (Leigh and Bryant 2015). Una delle funzioni di questo programma è la creazione di network di aplotipi finalizzati alla comprensione delle relazioni evolutive tra popolazioni. Il network di aplotipi è stato ottenuto usando il metodo TCS (Templeton et al. 1992) che consente di stimare le relazioni evolutive tra popolazioni e individui che mostrano bassa divergenza genetica (Georgiadis et al. 1994;

Routman et al. 1994; Gerber and Templeton 1996; Vilà et al. 1999; Gómez-Zurita et al. 2000). L'algoritmo TCS analizza le sequenze nucleotidiche, raggruppa in un unico aplotipo quelle identiche e calcola la frequenza di ciascuno di questi aplotipi nel campione. L'algoritmo si basa sul metodo statistico della parsimonia, secondo cui la migliore rappresentazione delle relazioni evolutive tra aplotipi è quella che prevede il minor numero di eventi mutazionali. Questo metodo viene preferito ai metodi filogenetici classici di costruzione di alberi, in quanto risulta più adatto per indagare le relazioni tra aplotipi strettamente correlati, come accade nelle analisi intraspecifiche. I metodi filogenetici classici assumono che gli aplotipi ancestrali non siano più presenti in una popolazione, mentre la teoria della coalescenza prevede che, in uno studio di popolazioni, le sequenze più frequentemente campionate siano proprio gli aplotipi ancestrali (Watterson and Guess 1977; Donnelly and Tavaré 1986; Crandall and Templeton 1993). Infatti gli aplotipi individuati come ancestrali vengono collocati all'interno del network, in posizioni centrali rispetto a quelli da essi derivati, contrariamente a quanto avviene negli alberi filogenetici in cui tutti gli elementi indagati sono rappresentati come nodi terminali (Posada and Crandall 2001).

Di seguito sono riportati i 27 aplotipi mitocondriali del gene 12S rRNA, distribuiti per i 404 campioni genotipizzati, determinati nelle diverse popolazioni di *T. hermanni* in studi precedenti (Perez et al. 2014). Per ogni aplotipo sono indicati il numero di individui e la popolazione di cui fanno parte (Tab. 1).

Tabella 1. Ripartizione degli individui di ciascuna popolazione di *T. hermanni* nei relativi aplotipi mitocondriali 12S rRNA (da Perez et al. 2014).

Aplotipi	Numero di individui per popolazione
TH1	Bosco Mesola n=2
TH2	Bosco Mesola n=1
TH3	Bosco Mesola n=35; Bosco Nordio n=1; Appia antica n=6; Abruzzo n=2; Francia n=1; Meteore n=1; Macedonia n=6; Croazia n=4
TH4	Bosco Mesola n=1; Appia a. n=1; Francia n=1; Meteore n=3; Aliko K. n=16; Epanomi n=22; Lake Kerkini n=8; Macedonia n=4
TH5	Bosco Mesola n=1; Bosco Nordio n=2; Appia a. n=1; Puglia n=5; Abruzzo n=10; Uccellina n=2; Macchiagrande n=6; Castelporziano n=6; Nebrodi n=12; Francia n=1; Corsica n=29; Spagna n=9
TH6	Spagna n=2
TH7	Spagna n=1
TH8	Francia n=165
TH10	Puglia n=1; Abruzzo n=1
TH11	Francia n=1
TH12	Puglia n=1
TH13	Bosco Mesola n=3
TH15	Macchiagrande n=2; Castelporziano n=1; Nebrodi n=1
TH17	Macchiagrande n=1; Meteore n=1; Epanomi n=1
TH19	Bosco Mesola n=2
TH20	Castelporziano n=1
TH21	Meteore n=3; Aliko K n=3; Lake Kerkini n=4
TH22	Epanomi n=1
TH23	Epanomi n=1
TH24	Lake Kerkini n=1
TH25	Meteore n=1
TH26	Aliko K. n=1
TH27	Bosco Nordio n=1
TH28	Bosco Nordio n=1
TH29	Bosco Nordio n=1
TH30	Epanomi n=1
TH31	Lake Kerkini n=1

2.2.4.2 Loci microsatelliti

I risultati dell'elettroforesi dei prodotti di PCR vengono visualizzati sotto forma di un elettroferogramma che mostra una serie di picchi la cui altezza è proporzionale alla lunghezza del frammento amplificato. La lettura e l'eventuale correzione dei picchi è avvenuta tramite l'utilizzo del software GeneMapper 4.1 specifico per la genotipizzazione di loci microsatelliti; facendo riferimento ad uno standard di peso molecolare, il programma identifica i picchi di ciascun locus assegnando ad ognuno un numero che corrisponde al numero di ripetizioni. Grazie al software GeneMapper è possibile caratterizzare ogni individuo con un tipico profilo genetico per i loci in esame.

Sono stati condotti test di assegnazione ed esclusione, utilizzando STRUCTURE e GeneClass2 rispettivamente, sui 14 individui genotipizzati per i 7 loci microsatelliti, usando come reference gli individui genotipizzati e suddivisi in popolazioni (vedere capitolo 1) (Fig. 5):

1. GRE = Grecia
2. MCM = Macedonia-Bosco Mesola- Croazia
3. ITP = Italia peninsulare
4. CAL = Calabria
5. ISS = Spagna e isole
6. FRA = Francia

I primi 2 cluster comprendono individui appartenenti alla sottospecie *T. h. boettgeri*, gli ultimi 4 comprendono le popolazioni occidentali che appartengono alla sottospecie *T. h. hermanni*.

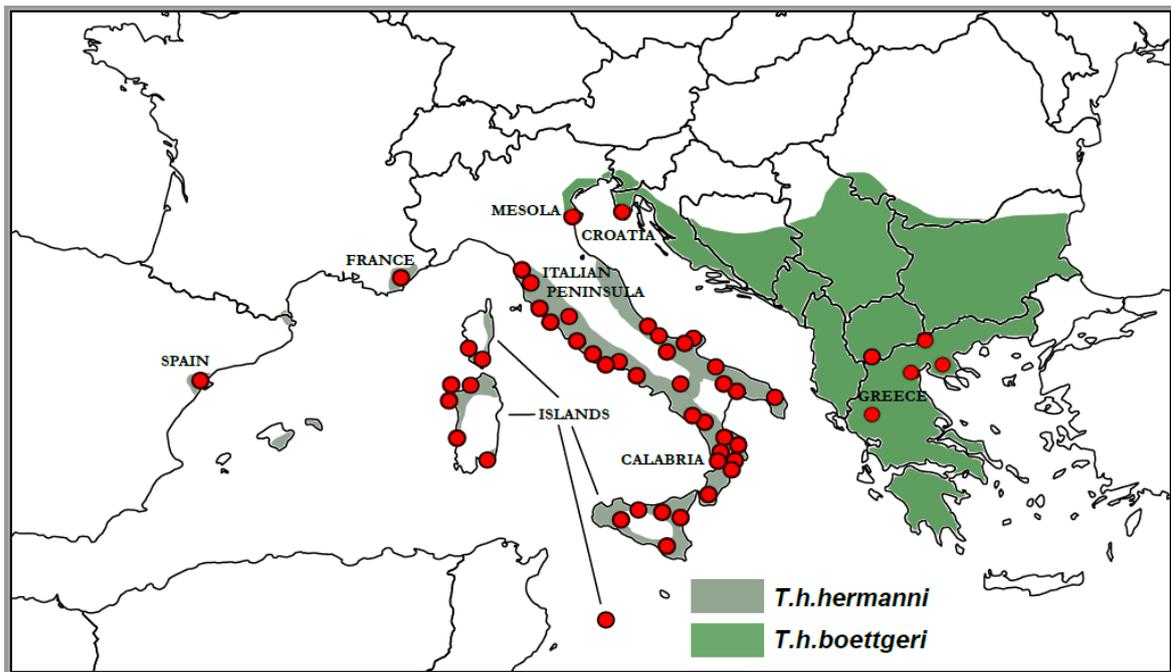


Figura 5. Distribuzione geografica dei 6 cluster di *T. hermanni* basati sui genotipi di loci STR. I cluster Grecia e BoscoMesola-Croazia-Macedonia fanno parte della sottospecie *T. h. boettgeri*; I cluster Francia, Spagna e isole, Italia peninsulare e Calabria, appartengono alla sottospecie *T. h. hermanni* (vedere capitolo 1).

I dati genetici derivati dai loci microsatelliti sono stati utilizzati per svolgere un'analisi fattoriale delle corrispondenze (AFC). Tale analisi è particolarmente adatta per descrivere le associazioni tra due o più variabili qualitative. Attraverso un'analisi fattoriale è possibile ridurre il numero delle variabili in esame, estraendo da un gruppo di variabili correlate fra loro un numero inferiore di fattori ortogonali che rappresentano le correlazioni esistenti tra le variabili di partenza. Tale metodo risponde alla necessità di rappresentare la complessità di un fenomeno, evidenziata da un numero elevato di variabili, attraverso un numero ridotto di indicatori sintetici (i fattori) particolarmente significativi per spiegare il fenomeno stesso. Nell'AFC vengono analizzati variabili ed individui, studiandone il legame; il risultato è la rappresentazione in uno spazio euclideo della variabilità dei singoli individui che compongono le popolazioni. All'interno di un grafico delimitato da assi ortogonali, ogni singolo individuo è rappresentato da un punto e la distanza tra due punti sarà direttamente proporzionale alla somiglianza di quegli individui per le variabili considerate. L'analisi AFC dei campioni è stata svolta utilizzando il software GENETIX 4.05 (Belkhir 2004).

2.3 Risultati

2.3.1 DNA mitocondriale

Le sequenze del gene 12S rRNA sono state ottenute per ognuno dei 14 campioni sotto analisi; la lunghezza del frammento del gene era di 296 bp. Le sequenze dei campioni ARE sono state allineate ad un dataset di sequenze dello stesso gene mitocondriale, composto da 404 individui, ottenute in studi precedenti (Perez et al. 2014).

Utilizzando il programma PopArt, è stato costruito un network di aplotipi (Fig. 6) secondo il metodo TCS (Templeton et al. 1992) basato sulla parsimonia statistica. I singoli aplotipi sono uniti tra loro tramite linee in cui ogni piccolo segmento perpendicolare indica una mutazione (sostituzione nucleotidica).

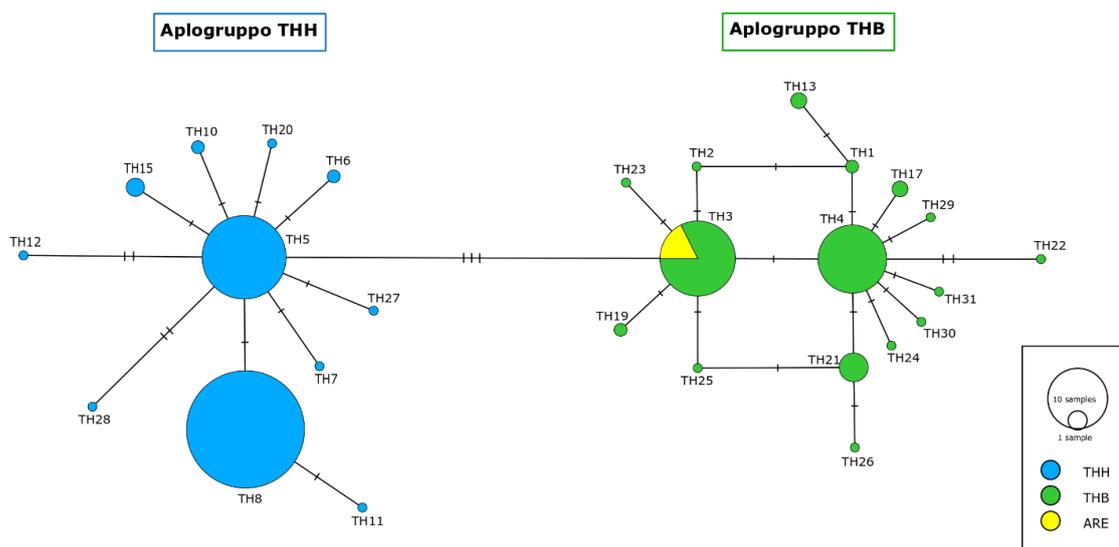


Figura 6. Network di aplotipi del gene mitocondriale 12S rRNA. In azzurro sono rappresentati gli aplotipi appartenenti all'aplograppo THH, corrispondente alla sottospecie *T. h. hermanni*; in verde gli aplotipi dell'aplograppo THB, corrispondente alla sottospecie *T. h. boettgeri*. I campioni ARE, in giallo, sono compresi all'interno dell'aplotipo orientale TH3 contenente le popolazioni di Macedonia, Croazia, Bosco Mesola. I singoli aplotipi sono uniti tra loro tramite linee in cui ogni piccolo segmento perpendicolare indica una mutazione (sostituzione nucleotidica).

I 27 aplotipi sono raggruppati in due differenti aplogruppi: THH e THB. I due aplogruppi coincidevano con la suddivisione sub-specifica: nella parte sinistra del network, in azzurro, sono rappresentati gli aplotipi di *T. h. hermanni* separati da quelli di *T. h. boettgeri*, in verde, da almeno 3 sostituzioni. I due cluster mostrano la classica tipologia a stella in cui gli aplotipi più rappresentati sono in posizioni centrali (TH5 per *T. h. hermanni* e TH3 e TH4 per *T. h. boettgeri*); da questi si dipartono gli altri aplotipi che si discostano solitamente per una

sostituzione (solo 3 aplotipi sono separati da quelli centrali da 2 sostituzioni) (Perez et al. 2014).

Tutti i 14 campioni ARE, rappresentati in giallo, mostravano lo stesso aplotipo TH3, in cui sono compresi i campioni di Croazia (n=4), Macedonia (n=6), Bosco Mesola (n=35), Bosco Nordio (n=1), Meteore (n=1), Appia antica (n=6), Abruzzo (n=2), Francia (n=1); questi ultimi 9 individui campionati in Italia e Francia, sono molto probabilmente esemplari di *T. h. boettgeri* importati e poi reintrodotti accidentalmente nell'areale occidentale. Tale aplotipo era separato da una sola sostituzione dall'altro aplotipo più comune, TH4, che include la maggior parte dei campioni della Grecia.

2.3.2 Loci microsatelliti

Dopo aver genotipizzato i 14 campioni di *T. hermanni* tramite l'analisi di 7 loci microsatelliti, sono stati eseguiti i test di assegnazione con STRUCTURE (Tab. 2). I campioni ARE mostravano una probabilità molto alta di appartenere alla popolazione che comprende i campioni di Macedonia, Croazia e Bosco Mesola; in tutti i casi, tale probabilità corrispondeva al 100% o comunque a valori molto vicini. I campioni ARE01, ARE02, ARE09 e ARE14 mostravano anche la probabilità di appartenere alla popolazione della Grecia, ma tali valori erano molto bassi (rispettivamente 0,1%, 0,5%, 2,4% e 0,1%).

Tabella 2. Risultati del test di assegnazione svolto con il programma STRUCTURE. I valori riportati sono in percentuale. GRE = Grecia; MCM = Bosco Mesola, Croazia e Macedonia; ITP = Italia Peninsulare; CAL = Calabria; ISS = Isole Mediterranee e Spagna; FRA = Francia.

Campioni	GRE	MCM	ITP	CAL	ISS	FRA
ARE 01	0.1	99.9	0	0	0	0
ARE 02	0.5	99.5	0	0	0	0
ARE 03	0	100	0	0	0	0
ARE 04	0	100	0	0	0	0
ARE 05	0	100	0	0	0	0
ARE 06	0	100	0	0	0	0
ARE 07	0	100	0	0	0	0
ARE 08	0	100	0	0	0	0
ARE 09	2.4	97.6	0	0	0	0
ARE 10	0	100	0	0	0	0
ARE 11	0	100	0	0	0	0
ARE 12	0	100	0	0	0	0
ARE 13	0	100	0	0	0	0
ARE 14	0.1	99.9	0	0	0	0

I risultati di STRUCTURE possono essere visualizzati tramite un barplot (Fig. 7) in cui ogni individuo è rappresentato da una sottile colonna verticale che è colorata in base alla composizione genetica dell'individuo stesso; individui dello stesso colore sono originari della medesima popolazione.

Tutti gli individui ARE sono colorati in arancione, come la maggior parte dei campioni del cluster Macedonia-Bosco Mesola-Croazia, indicando la loro somiglianza genetica con tali popolazioni.

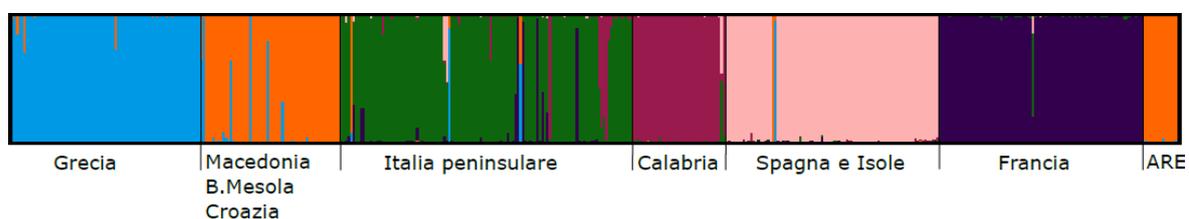


Figura 7. Barplot che rappresenta la composizione genetica dei singoli individui (linee verticali) risultante da analisi precedenti di STRUCTURE con $K=6$. Gli individui ARE sono colorati in arancione, come la maggior parte degli individui del cluster Macedonia-Bosco Mesola-Croazia, indicandone la vicinanza genetica.

Grazie al software GeneClass2, è stato possibile eseguire un test di esclusione i cui risultati sono mostrati nella tabella seguente (Tab. 3). I valori riportati indicano la probabilità per ogni campione di appartenere ad ognuna delle popolazioni presenti nella *reference*. Quando

la probabilità di un dato individuo in una data popolazione è inferiore al valore soglia, che indica il livello di significatività (α) che è stato precedentemente stabilito (in questo caso $\alpha=0,01$), possiamo escludere con un buon livello di confidenza che quell'individuo appartenga alla popolazione su cui è stato eseguito il test.

Tabella 3. Risultati del test di esclusione svolto con il programma GeneClass2. GRE = Grecia; MCM = Bosco Mesola, Croazia e Macedonia; ITP = Italia Peninsulare; CAL = Calabria; ISS = Isole Mediterranee e Spagna; FRA = Francia.

Campioni	GRE	MCM	ITP	CAL	ISS	FRA
ARE 01	0.000	0.155	0.001	0.000	0.002	0.000
ARE 02	0.000	0.129	0.000	0.000	0.002	0.000
ARE 03	0.000	0.819	0.004	0.000	0.005	0.000
ARE 04	0.006	0.696	0.002	0.000	0.006	0.000
ARE 05	0.040	0.958	0.001	0.000	0.001	0.000
ARE 06	0.005	0.585	0.002	0.000	0.008	0.000
ARE 07	0.001	0.968	0.003	0.000	0.002	0.000
ARE 08	0.000	0.500	0.003	0.000	0.006	0.000
ARE 09	0.124	0.743	0.002	0.000	0.020	0.000
ARE 10	0.000	0.713	0.004	0.000	0.076	0.000
ARE 11	0.026	0.976	0.000	0.000	0.000	0.000
ARE 12	0.000	0.722	0.003	0.000	0.008	0.000
ARE 13	0.000	0.756	0.004	0.000	0.006	0.000
ARE 14	0.001	0.459	0.001	0.000	0.000	0.000

Il test di esclusione confermava i risultati del test di assegnazione; infatti per tutti i campioni, la probabilità di appartenere alla popolazione Macedonia-Bosco Mesola-Croazia era superiore al livello di significatività; 12 campioni riportavano un valore significativo di probabilità esclusivamente per la suddetta popolazione; per il campione ARE09 la probabilità di appartenere alla popolazione della Grecia risulta significativa, e il campione ARE10 mostrava una probabilità, con valore sopra la soglia, di appartenere al clade di Spagna e Isole; entrambi questi valori erano però molto inferiori rispetto a quelli indicati per la popolazione Macedonia-Bosco Mesola-Croazia.

I genotipi dei campioni ARE sono stati uniti a quelli di tutti gli individui di *T. hermanni* precedentemente analizzati, presenti nel dataset utilizzato come reference per i test di

assegnazione ed esclusione, per essere sottoposti ad un'analisi fattoriale delle corrispondenze (AFC) utilizzando il software GENETIX 4.05. In questo tipo di rappresentazione grafica, i campioni sono disposti a formare nuvole di punti e la loro posizione è data dalla frequenza allelica in rapporto agli altri individui. Il grafico risultante dall'analisi AFC (Fig. 8) mostrava una netta divisione delle popolazioni in 2 gruppi principali: nella parte sinistra del grafico erano presenti le popolazioni occidentali (Francia, Spagna e isole, Italia peninsulare, Calabria) che appartengono alla sottospecie *T. h. hermanni*; a destra invece quelle delle popolazioni della Grecia e del clade Macedonia-Bosco Mesola-Croazia, che corrispondono alla sottospecie *T. h. boettgeri*. I 14 campioni ARE mostravano una distribuzione orizzontale all'interno di quest'ultimo gruppo, ma leggermente spostata verso la parte centrale del grafico, dove erano collocati gli individui appartenenti alla popolazione Macedonia-Bosco Mesola-Croazia, (i campioni della Macedonia sono più spostati verso il basso). Nella parte più a destra del grafico, erano presenti gli individui appartenenti alle popolazioni della Grecia.

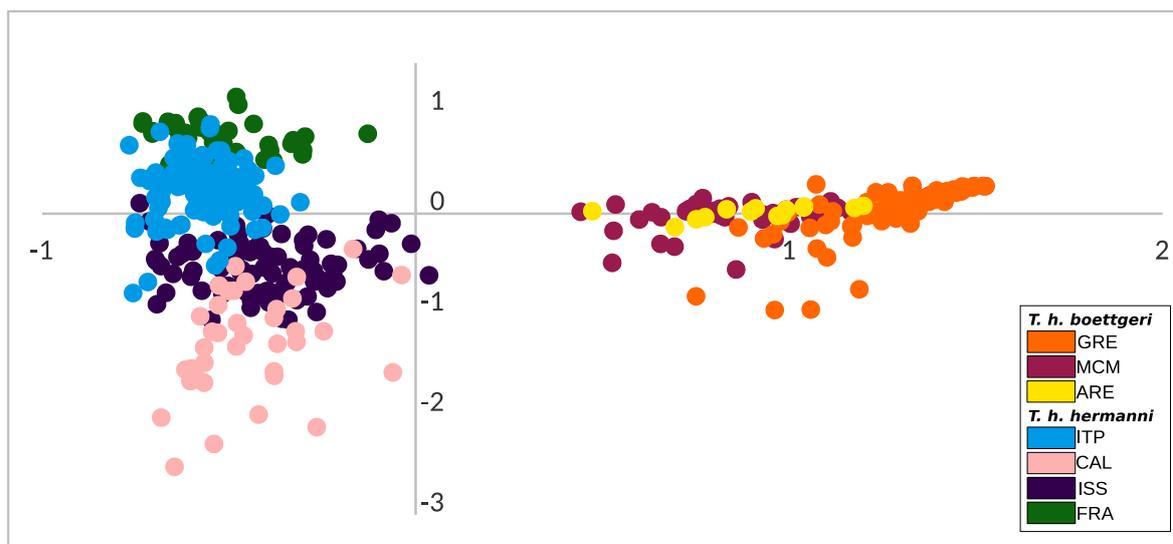


Figura 8. Grafico dell'AFC svolta mediante il programma Genetix 4.05 (Belkhir et al. 2004). Ogni cerchio rappresenta un individuo; individui appartenenti allo stesso cluster mostrano lo stesso colore. I campioni ARE sono rappresentati in giallo. GRE = Grecia; MCM = Bosco Mesola, Croazia e Macedonia; ITP = Italia Peninsulare; CAL = Calabria; ISS = Isole Mediterranee e Spagna; FRA = Francia.

Un'ulteriore analisi AFC è stata svolta includendo nel dataset i soli campioni di *T. h. boettgeri*, compresi i 14 campioni ARE. Il grafico risultante (Fig. 9) mostrava la suddivisione tra il cluster della Grecia e il cluster Macedonia-Bosco Mesola-Croazia lungo l'asse

orizzontale. I 14 campioni ARE erano collocati all'interno di quest'ultimo cluster, con alcuni spostati lungo l'asse verticale.

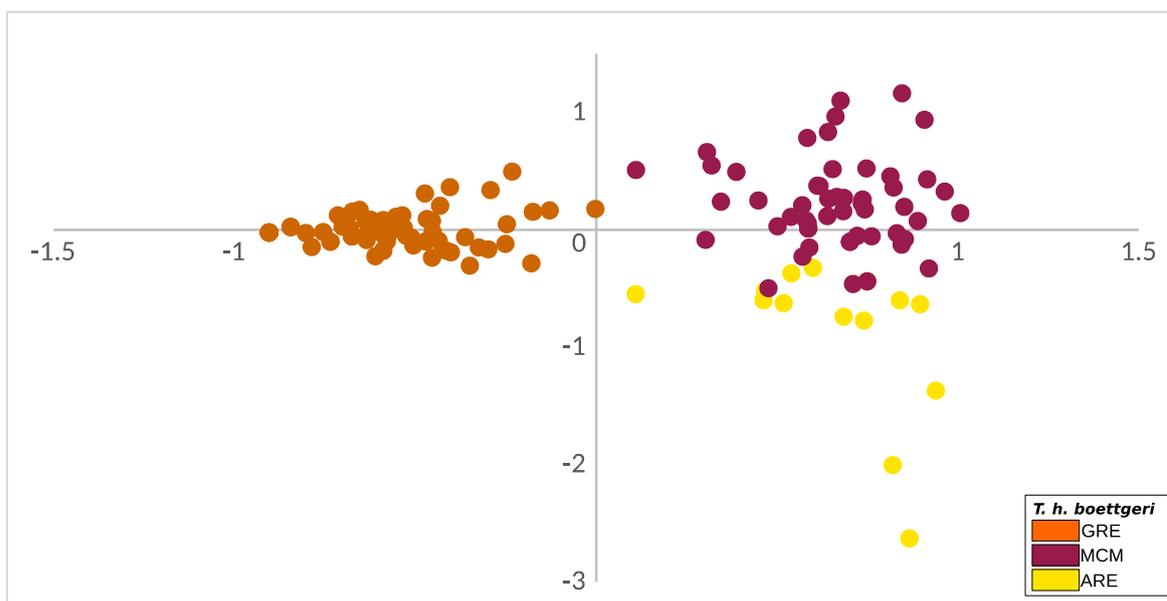


Figura 9. Grafico dell'AFC svolta mediante il programma Genetix 4.05 (Belkhir et al. 2004). Ogni cerchio rappresenta un individuo; individui appartenenti allo stesso cluster mostrano lo stesso colore. I campioni ARE sono rappresentati in giallo. GRE = Grecia; MCM = Bosco Mesola, Croazia e Macedonia.

2.4 Discussione

La classificazione tassonomica della *T. hermanni* è da tempo oggetto di dispute; ad oggi è ufficialmente riconosciuta una sola specie (*T. hermanni*), comprendente 2 sottospecie (*T. h. hermanni* con areale occidentale e *T. h. boettgeri* con areale orientale), ma recentemente è stato proposto il riconoscimento di una nuova specie, *T. hercegovinensis*, per le popolazioni di *T. hermanni* che occupano le coste adriatiche della penisola balcanica (Croazia, Montenegro, Bosnia-Herzegovina); tali popolazioni mostrano caratteri fenotipici peculiari che giustificherebbero la loro separazione dalla sottospecie *T. h. boettgeri* nella quale sono attualmente ascritte (Perälä 2002b, 2004). Nonostante i risultati delle analisi molecolari non supportino questa classificazione (Fritz et al. 2006, Perez et al. 2014), il dibattito sull'identità tassonomica di queste popolazioni non è ancora concluso e molti continuano a sostenere la necessità di considerarle almeno come sottospecie a sé stante; inoltre, spesso questi esemplari vengono venduti dagli allevatori come *T. hercegovinensis* o *T. h. hercegovinensis*. Lo studio svolto in questo capitolo è finalizzato a chiarire lo status tassonomico di queste popolazioni endemiche di Croazia, Bosnia-Herzegovina e Montenegro, tramite l'analisi di

14 esemplari di *T. hermanni* che si trovano attualmente nell'allevamento Testudoalbino ad Arezzo, ma che provengono da siti naturali lungo la costa adriatica della penisola balcanica. Sono stati osservati i caratteri morfologici dei campioni per assicurarsi che manifestassero le caratteristiche tipiche dell'ipotetico taxon "hercegovinensis", e sono state condotte analisi genetiche utilizzando un marker mitocondriale (gene 12S rRNA) e marker nucleari (7 loci microsatelliti) allo scopo di genotipizzare i 14 individui; in tal modo è stato possibile confrontare ciascun individuo con le popolazioni naturali distribuite in tutto l'areale della specie (le regioni costiere che vanno dalla Spagna alla Grecia, passando per Francia, Italia, Croazia, Macedonia, e alcune isole mediterranee quali Corsica, Sicilia e Sardegna) grazie alle informazioni risultanti da precedenti studi su tali popolazioni (vedere capitolo 1).

I 14 individui dello studio mostrano i tratti morfologici che caratterizzano la forma "hercegovinensis": le macchie nere del piastrone sono più scure e uniformi rispetto a quelle tipicamente presenti in *T. h. boettgeri* (Fig. 4a), il rapporto tra sutura pettorale e sutura femorale è molto vicino a 1 (Fig. 4b), i colori del carapace sono più contrastati rispetto a quelli di *T. h. boettgeri* (Fig. 4c) e in tutti i 14 individui è stata riscontrata l'assenza di scaglie inguinali (Fig. 4d) che rappresenta il carattere diagnostico chiave per l'identificazione di *T. hercegovinensis* (Perälä 2002b). Per le analisi molecolari ci si è avvalsi di 2 tipologie di marker (mitocondriale e nucleare) in modo da ottenere informazioni congiunte per stimare con maggiore precisione la correlazione genetica dei 14 campioni con le popolazioni di individui già caratterizzati geneticamente per entrambi i tipi di marker. Il gene mitocondriale 12S rRNA è un marker mitocondriale filogeograficamente informativo e utilizzato in precedenti studi sulla distribuzione geografica e sulla diversità genetica di *T. hermanni* (van der Kuyl et al. 2002, Mirimin et al. 2004, Perez et al. 2014). In base alle sequenze del gene 12S rRNA è stato costruito un network di aplotipi (Fig. 6) per rilevare quale fosse l'aplotipo dei campioni del nostro studio. Dall'analisi è emerso che i 14 individui condividono lo stesso aplotipo (TH3), che costituisce uno dei due aplotipi più frequenti all'interno dell'aplogruppo THB, caratteristico della sottospecie *T. h. boettgeri*; all'interno dell'aplotipo TH3 sono presenti individui provenienti da Croazia, Macedonia, Bosco Mesola, e alcuni individui campionati in Italia e Francia che molto probabilmente rappresentano esemplari di *T. h. boettgeri* importati dai Balcani e rilasciati accidentalmente nell'areale occidentale. L'aplotipo TH3 si discosta dall'aplotipo TH4 (contenente la quasi totalità dei campioni greci) per una singola mutazione. I risultati delle analisi mitocondriali suggeriscono che i 14 campioni ARE sono da considerarsi a tutti gli effetti esemplari appartenenti alla sottospecie *T. h. boettgeri*.

Oltre al marker mitocondriale, sono state condotte analisi su 7 loci microsatelliti, già utilizzati in precedenti studi di genotipizzazione di popolazioni di *T. hermanni* (Perez et al. 2014; vedere capitolo 1). Questi loci microsatelliti sono stati usati per condurre un test di assegnazione e un test di esclusione, allo scopo di testare la provenienza geografica dei 14 campioni dello studio.

I 14 campioni, tramite STRUCTURE, sono stati assegnati con una probabilità statistica molto alta (dal 97,6 % al 100%) alle popolazioni che occupano la parte di areale corrispondente a Croazia, Macedonia e Bosco Mesola. I 14 individui mostrano quindi un genotipo per i loci STR molto simile agli individui originari di queste aree geografiche.

Il test di esclusione eseguito con GeneClass2 ha mostrato per ognuno dei 14 campioni, un valore significativamente alto per il cluster Macedonia-Bosco Mesola-Croazia, confermando i risultati dei test di assegnazione.

Basandosi sui 7 loci STR, è stata inoltre svolta un'analisi fattoriale delle corrispondenze (AFC) che permette la rappresentazione in uno spazio bidimensionale della collocazione degli individui in relazione al loro genotipo multilocus in rapporto agli altri individui, consentendo quindi di capire a quale popolazione sono maggiormente correlati i campioni dello studio. Il grafici risultanti dall'AFC (Fig. 8-9) mostrano la collocazione dei 14 individui tra gli esemplari della sottospecie *T. h. boettgeri*, in particolare nella stessa posizione degli esemplari della popolazione Macedonia-Bosco Mesola-Croazia, che risulta più spostata verso il centro del grafico (Fig. 8); tali individui sembrano quindi discostarsi leggermente dalle popolazioni della Grecia, pur rimanendo all'interno del gruppo di *T. h. boettgeri*.

Dai dati ottenuti dalle analisi di entrambi i tipi di marker (mtDNA e loci STR), si può affermare che i 14 campioni dello studio, così come le popolazioni di Croazia, Macedonia e Bosco Mesola a cui sono strettamente correlati, devono essere classificati come *T. h. boettgeri* poiché non è stata riscontrata una divergenza genetica che possa giustificare l'appartenenza di questi esemplari ad una sottospecie distinta. La vendita di tali testuggini con il nome di *T. hercegovinensis* (o *T. h. hercegovinesis*), andrebbe regolamentata in quanto tale classificazione non ha valore scientifico. Nonostante tali popolazioni non siano geneticamente separate dal clade della sottospecie orientale, esse mostrano comunque alcune caratteristiche fenotipiche peculiari; in realtà, le variazioni fenotipiche popolazione-specifiche sono un fenomeno piuttosto comune nelle specie del genere Testudo (Guyot and Devaux 1997; Fritz et al. 2007, 2009).

I tratti morfologici soggetti a variabilità (forma e dimensioni del carapace, pattern di colorazione, divisione degli scuti) sono stati ripetutamente usati come caratteri diagnostici per la classificazione tassonomica, portando a continue proposte di rivalutazione di diversi taxa (Pieh 2001, Perälä 2002a, Pieh & Perälä 2002, 2004). Studi molecolari hanno però rilevato che la spiccata variabilità fenotipica delle popolazioni distribuite in differenti regioni geografiche, non viene supportata da una divergenza nei marker molecolari, dimostrando che tali variazioni morfologiche sono popolazione-specifiche e non hanno valore tassonomico (Harris et al. 2003; Carretero et al. 2005). Una delle possibili cause della diversità morfologica inter-popolazione è la plasticità fenotipica, la quale è definita come la capacità di un individuo di sviluppare diverse risposte fenotipiche in base a specifici cambiamenti ambientali (Stearns 1989; Via 1993). Tale meccanismo sembra infatti avere un ruolo importante nel modellare la morfologia esterna delle testuggini (Fritz et al. 2005, 2007, 2010, 2012). Nelle specie *Testudo graeca* e *Testudo marginata*, è stato riscontrato come diverse condizioni ambientali possano determinare considerevoli variazioni morfometriche (ad esempio le ridotte dimensioni in individui che vivono in regioni aride) indicando una particolare predisposizione delle testuggini alla plasticità fenotipica (Guyot and Devaux 1997; Fritz et al. 2005, 2007; Široký and Fritz 2007). Nelle popolazioni di *T. graeca* del Marocco, la variabilità morfologica sembra essere correlata alla frequenza delle precipitazioni e alle temperature, suggerendo che la massa corporea delle testuggini dipenda dal loro grado di idratazione (Willemsen and Hailey 2002).

Altri studi hanno evidenziato come sia le dimensioni del carapace, sia il grado di pigmentazione di carapace e piastrone, seguano una variazione clinale in relazione alla latitudine, e quindi probabilmente alle condizioni climatiche, confermando che la variazione morfologica continua sia un pattern tipico della specie (Willemsen and Hailey 1999a, b; Sacchi et al. 2007). Abbiamo notato che le popolazioni di Croazia, Bosnia-Herzegovina e Montenegro possiedono caratteristiche intermedie tra le due sottospecie di *T. hermanni*, ciò sembra creare una variazione fenotipica continua dall'areale occidentale verso quello orientale. La presenza di differenze morfologiche nelle popolazioni della costa adriatica può essere interpretata anche come risultato della deriva genetica; le differenze fenotipiche potrebbero essere dovute ad un effetto del fondatore (o ad un bottleneck), che casualmente ha portato alla fissazione di alcune caratteristiche morfologiche in tempi relativamente recenti, e ciò spiegherebbe l'assenza di una significativa differenziazione a livello genetico. Un'altra ipotesi sulla variabilità delle popolazioni di *T. h. boettgeri* viene fornita da un'analisi paleogeografica: durante l'ultima glaciazione, la penisola Balcanica era

caratterizzata dalla presenza di diversi rifugi glaciali in cui le popolazioni orientali di *T. hermanni* poterono sopravvivere e iniziare a differenziarsi in condizioni di isolamento riproduttivo; successivamente, nel periodo post-glaciale, le diverse popolazioni si sarebbero ridistribuite ampiamente all'interno della penisola Balcanica, ripristinando il flusso genico e creando una sorta di fusione tra i vari fenotipi; le popolazioni di *T. hermanni* della variante "hercegovinensis" potrebbero essersi originate dall'incontro di alcune popolazioni della sottospecie orientale con individui della sottospecie occidentale, nella zona di contatto tra i due areali (corrispondente alla costa adriatica dell'Italia settentrionale) producendo una certa intergradazione nei caratteri fenotipici.

Non si può inoltre escludere che tali caratteristiche morfologiche siano il risultato di pressioni selettive (naturali e/o sessuali); alcuni studi hanno messo in evidenza come la colorazione del carapace sia correlata alla tipologia di habitat e al colore del substrato (Fritz et al. 1996, 2007, 2009); secondo altri studi, il grado di pigmentazione potrebbe essere condizionato dall'intensità delle radiazioni solari (Guyot & Devaux, 1997, Willesen & Hailey, 1999b, Ljubisavljević et al. 2012); la variazione nella forma e dimensione del carapace può inoltre essere il risultato della combinazione tra selezione sessuale e naturale (Carretero et al. 2005). Le diverse forme fenotipiche potrebbero quindi essere l'espressione di polimorfismi genetici intraspecifici dovuti a divergenze adattative, senza che si sia manifestata una concomitante divergenza nei marker neutrali (o quasi-neutrali), quali microsatelliti e mtDNA (Piertney et al. 2001; Summers et al. 2002). I tratti che determinano le variazioni fenotipiche dipendono dall'ambiente, mentre questo non accade per i marker molecolari, i quali risultano quindi inefficaci nel rilevare eventuali variazioni nei tratti quantitativi quando agisce la selezione, ad esempio in caso di adattamenti locali (Reed and Frankham 2001). La debole correlazione tra la variazione fenotipica e quella molecolare è una questione da tener presente in studi di genetica di conservazione ed evolutiva; molti autori ritengono che la sola misura della divergenza nei marcatori molecolari standard non sia sufficiente per avere un quadro esaustivo sulle differenze adattative e sul potenziale evolutivo di popolazioni conspecifiche (Hedrick et al. 1996; Karhu et al. 1996; Crandall et al. 2000).

Lo studio delle peculiarità morfologiche tra le popolazioni di *T. hermanni* dimostra la capacità delle testuggini di modificare il proprio fenotipo in poche centinaia o migliaia di anni, sia a causa di pressioni ambientali, sia per effetto della deriva genetica (Fritz et al. 2005).

Nel caso di questo studio, le caratteristiche morfologiche delle popolazioni della variante “hercegovinensis” non sono significativamente marcate e risulta arduo immaginare che possano riflettere uno specifico adattamento locale; tali evidenze suggeriscono che ritenere tali popolazioni un’unità di gestione indipendente può essere un provvedimento insensato e risulta più ragionevole considerarle una delle tante forme geografiche che caratterizzano la sottospecie orientale *T. h boettgeri*. Per avere risultati il più possibile esaustivi, è necessario condurre analisi su un numero più ampio di campioni di *T. hermanni* provenienti da quella porzione di areale ed esaminarne anche le caratteristiche adattative, valutando la variazione genetica dei tratti fisiologici, di life history e comportamentali. Sarebbe interessante, inoltre, condurre esperimenti di traslocazione incrociata e di manipolazione dell’ambiente di incubazione, al fine di indagare l’inclinazione alle modificazioni fenotipiche delle testuggini in risposta a diverse condizioni ambientali.

Questo studio ha inoltre contribuito ad ampliare le informazioni riguardanti le diverse popolazioni di *T. hermanni*; gli studi di genetica di conservazione rendono infatti possibile la creazione di database ricchi di informazioni per le specie in pericolo di estinzione. È auspicabile poter incrementare l’archivio che raccoglie le informazioni sulle popolazioni naturali di *T. hermanni*, continuando ad effettuare campionamenti in quelle aree che al momento sono state meno indagate, così da poter delineare un quadro sempre più definito sulla tassonomia e sulla distribuzione della testuggine di Hermann nel suo habitat.

Capitolo 3: Confronto tra SNP e STR per analizzare la struttura genetica di popolazioni in *Testudo hermanni* e sviluppo di un pannello informativo per l'assegnazione geografica

3.1 Introduzione

L'approccio genomico, dal punto di vista della genetica di conservazione, offre un notevole aumento del numero di marcatori genetici variabili utilizzabili (es. SNP). Questo ha portato a migliorare la precisione delle stime di diversità e dei parametri demografici delle popolazioni (ad es. dimensioni effettive della popolazione) di rilevanza per la conservazione (Allendorf et al. 2010; Harrisson et al. 2014). Il sequenziamento dell'intero genoma, di porzioni mirate del genoma (Mamanova et al. 2010) o di un sottoinsieme casuale del genoma (es. ddRADseq) consentono di esaminare la diversità genomica ad un livello superiore rispetto ai marcatori genetici con meno loci (Shafer et al. 2015). Questi approcci, in particolare il (dd)RADseq, bypassano il laborioso processo di caratterizzazione dei marcatori e di sviluppo dei primer richiesto per i microsatelliti e danno la possibilità di poter essere confrontati e combinati tra laboratori diversi (aspetto molto più complicato nel caso dei loci microsatelliti).

Specialmente nel campo della genetica delle popolazioni i vantaggi che derivano dall'avere ampi dati sull'intero genoma sono evidenti. In particolare, i dati genomici dovrebbero migliorare le stime demografiche delle popolazioni (Luikart et al. 2003) e la caratterizzazione di processi come l'inbreeding (Hoffman et al. 2014; Kardos et al. 2014; Miller and Coltman 2014). Inoltre i dati genomici possono rivelarsi uno strumento utile per il monitoraggio (Hoban et al. 2014) o per l'inferenza di una struttura più fine di popolazione (Schafer et al. 2015).

L'obiettivo ultimo di questo lavoro è quello di sviluppare un pannello di SNP che consenta di ridurre i costi e velocizzare la genotipizzazione di individui di origine sconosciuta potenzialmente utilizzabili per progetti di reintroduzione. Questo ci permetterà di escludere eventuali ibridi ed identificare correttamente la più probabile origine di ogni testuggine. Questo però ha richiesto i seguenti step preliminari:

- svolgere un sequenziamento ddRAD (Double Digest Restriction Associated DNA) su 84 campioni *wild* di *Testudo hermanni*. Questo tipo di sequenziamento permette di tagliare il genoma (in presenza dei siti di restrizione) in piccole parti, grazie

- all'utilizzo di due enzimi di restrizione, e selezionarne un numero limitato da sequenziare (Peterson et al. 2012), per produrre infine un numero incredibilmente elevato di SNPs con costi relativamente ridotti (tramite NGS); questa parte del lavoro è stata completata in collaborazione con l'Università della Tuscia;
- analizzare la struttura genetica delle popolazioni naturali utilizzando migliaia di SNPs ottenuti e delineare macroaree da utilizzare come reference per test di assegnazione;
 - comparare le informazioni acquisite sul differenziamento genetico tramite SNPs e STR;
 - selezionare con vari metodi SNPs informativi e diagnostici per l'assegnazione geografica di individui di origine ignota alle macroaree ottenute con le analisi precedenti;
 - verificare la potenza statistica dei pannelli ottenuti attraverso test di self-assignment.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Campionamento e genotipizzazione

I dati genetici utilizzati in questo lavoro sono dati STR provenienti da campioni selvatici già utilizzati in passato (dataset di reference = 454 individui; vedi capitolo 1) e SNP sequenziati con la tecnica ddRAD su un sottocampione di 84 individui (dopo i filtri bioinformatici i campioni utilizzati per le analisi sono diventati 70; vedere Risultati), rappresentativi dei cluster genetici precedentemente identificati (Fig. 1). Il DNA di questi campioni è stato estratto di nuovo e processato per la costruzione delle library per il sequenziamento su Ion Torrent PGM. Il progetto è stato realizzato in collaborazione tra l'Università di Ferrara e l'Università della Tuscia. Il sequenziamento ddRAD è stato eseguito presso l'Università della Tuscia di Viterbo.

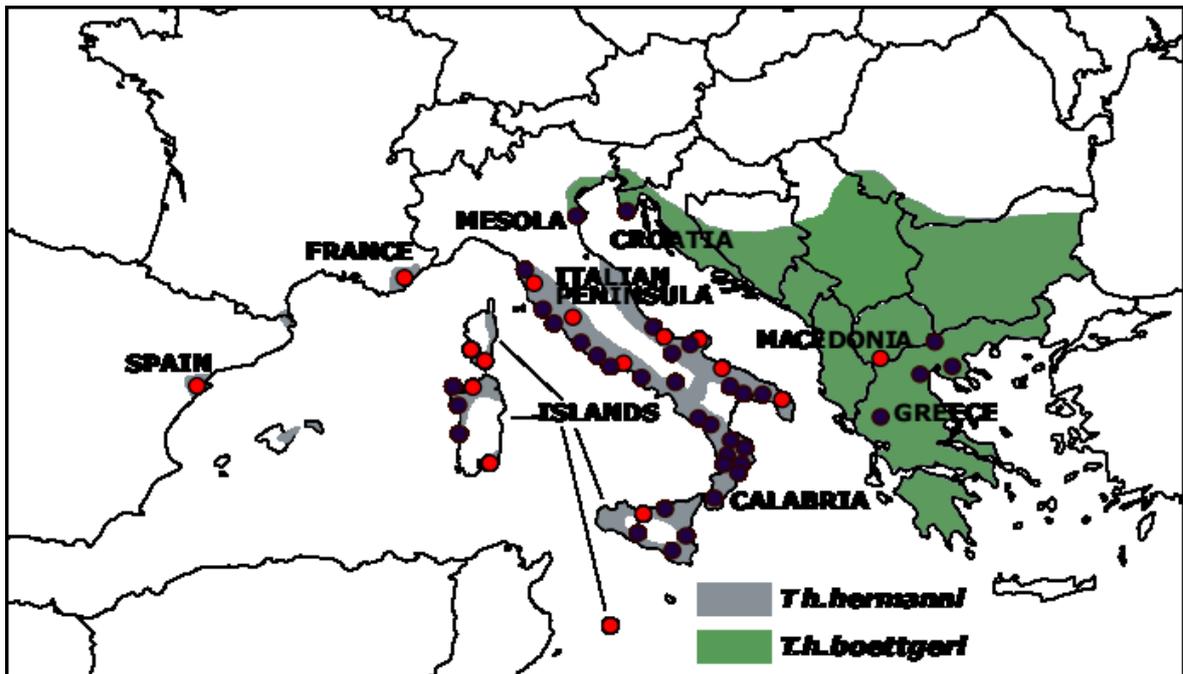


Figura 1. Mappa dei siti di campionamento di *T. hermanni*, lungo tutto il suo areale. I 70 campioni utilizzati per le analisi ddRADseq provengono dai siti in blu. I campioni utilizzati per le analisi STR invece provengono da tutti i siti in figura (blu e rossi).

3.2.2 Analisi dei dati STR

I dati STR sono stati prima di tutto controllati per il dropout degli alleli e per gli alleli nulli usando il software MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). Sono state stimate le deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) per ogni locus ed è stato testato il linkage equilibrium tra i loci utilizzando ARLEQUIN 3.5 (Excoffier and Lischer 2010). Per verificare le differenze tra i siti e le regioni nei livelli di diversità genetica, sono stati stimati diversi indici di diversità genetica, compreso il numero di alleli per locus, la ricchezza allelica, il coefficiente di inbreeding (FIS) e l'eterozigosità osservata e attesa utilizzando ARLEQUIN. I valori FST a coppie sono stati calcolati usando FSTAT (Goudet, J. 2002) secondo Weir and Cockerham (1984), correndo 9999 permutazioni e ai risultati è stato applicato il test di Bonferroni per confronti multipli.

Abbiamo eseguito analisi di clustering sul dataset *wild* completo utilizzando il metodo bayesiano implementato in STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) (vedere Materiali e Metodi, capitolo 1).

3.2.3 Analisi dei dati ddRADseq

Le reads generate dopo il sequenziamento sono state demultiplexate e suddivise in singoli file di dati utilizzando il programma PROCESS_RADTAGS nella versione 1.44 di STACKS (Catchen et al. 2011). Abbiamo usato TRIMMOMATIC (Bolger et al. 2014) per filtrare le nostre reads grezze rimuovendo gli adattatori “read-through”, quelle con bassa qualità (filtro leggero - modifica caso per caso) e quelle inferiori a 200 bp, e togliendo le prime due basi (le GG lasciate dal sito di restrizione). Le reads risultanti erano lunghe 200 bp per garantire la compatibilità per i passi successivi in STACKS, che richiede una lunghezza di reads uniforme durante la costruzione di loci de novo.

Dopo aver tagliato e filtrato per qualità le reads “grezze” provenienti dal sequenziamento, abbiamo usato i software USTACKS, CSTACKS e SSTACKS implementati in STACKS per creare loci de novo. Abbiamo specificato un minimo di cinque reads per locus per costruire il catalogo primario di *stacks* e consentito una distanza massima di sei mismatch nucleotidici tra gli *stacks*. Inoltre, abbiamo permesso la presenza massima di otto mismatch tra gli *stacks* durante la costruzione del catalogo perché i campioni del nostro dataset appartengono a due diverse sottospecie, quindi potenzialmente con un’alta variabilità tra di loro.

Dopo la mappatura de novo, è stata eseguita una fase iniziale di filtraggio dei dati utilizzando il pacchetto POPULATION in STACKS mantenendo solo quei loci presenti in almeno il 75% dei campioni in ciascun sito e con un massimo di 5 SNP per locus. Successivamente, è stata generata una whitelist di loci al fine di conservare solo gli SNPs biallelici genotipizzati.

Inoltre è stato prodotto anche un altro file vcf con l'opzione `write_single_snp` (oltre a quello completo con massimo 5 SNPs per locus) in modo da ottenere un dataset con un solo SNP per locus per minimizzare l’effetto linkage per analisi come STRUCTURE. I file vcf risultanti sono stati convertiti, usando PGDSPIDER versione 2.0.5.1 (Lischer and Excoffier 2012), in file input specifici per altri software.

I campioni sono stati assegnati alle popolazioni con il pacchetto fineRADstructure (Lawson et al. 2012) e i risultati visualizzati con RADpainter (Malinsky et al. 2018), entrambi specificatamente progettati per l'inferenza di popolazioni da dati RADseq. FineRADstructure è un metodo utilizzato per indagare la struttura delle popolazioni a partire da un gran numero di SNP per derivare una matrice di co-ancestry, il che significa che gli aplotipi più vicini condividono l'antenato più recente. RADpainter è un programma per rappresentare il risultato dell'analisi attraverso un albero che visualizza le relazioni tra i

diversi cluster genetici e una heatmap che mostra la percentuale a coppie di co-ancestry tra i campioni. Questo programma, rispetto a STRUCTURE, utilizza informazioni di linkage aplo-tipico, consentendo un raggruppamento più preciso degli individui. La matrice di co-ancestry, l'assegnazione degli individui alle popolazioni (utilizzando 100.000 iterazioni come burn-in prima di campionare 100.000 iterazioni) e il disegno dell'albero (utilizzando 10.000 iterazioni) sono stati eseguiti seguendo le istruzioni fornite dagli autori; successivamente sono stati utilizzati gli script R `FinestructureLibrary.R` e `fineRADstructurePlot.R` scaricati all'interno del pacchetto per visualizzare i risultati.

Valori a coppie degli FST sono stati stimati tra le popolazioni, ottenute con le analisi precedenti, utilizzando ARLEQUIN 3.5 (Excoffier and Lischer 2010).

3.2.4 Confronto tra STR e ddRADseq

Infine, abbiamo confrontato i risultati delle analisi sulla diversità genetica e sulla struttura di popolazione ottenuti con STR e ddRADseq per verificare la potenza dei due diversi marcatori (vedere Jeffries et al. 2016).

Al fine di analizzare le stesse popolazioni ma un diverso numero di campioni e diversi tipi di marcatori ci siamo concentrati soprattutto sul confronto tra il dataset ddRADseq completo (ddRADseq; 70 campioni, xSNPs) e un sottoinsieme del dataset STR completo (STR2; 298 campioni, 7 loci). Il dataset STR2 conteneva tutti gli individui per cui erano disponibili dati STR in località di campionamento utilizzate per il ddRADseq.

Successivamente, i dataset sono stati confrontati per l'eterozigosità, il coefficiente di ibridazione (FIS) e gli FST a coppie utilizzando il coefficiente di correlazione di Paerson e per la PCA usando come prior lo stesso numero di cluster per entrambi i dataset (8 gruppi rilevati sul dataset ddRAD; vedi sopra).

3.2.5 Validazione del pannello STR

La validazione è un processo necessario quando si confrontano diversi tipi di pannelli (con diversi marcatori e/o size), come in questo caso (per questo non è stata eseguita nel capitolo 1). Per validare il pannello di 7 loci STR è stato effettuato un test di self-assignment utilizzando il software GENECLASS 2.0 (Piry et al. 2004). Il metodo bayesiano (Rannala and Mountain 1997) implementato in GENECLASS è stato selezionato per l'esecuzione di test di self-assignment (procedura "leave-one-out") per valutare l'accuratezza

dell'assegnazione. Ciò significa che ogni individuo è stato escluso dalla potenziale popolazione di origine e quindi assegnato a una delle popolazioni identificate. I risultati riportati qui sono le proporzioni degli individui assegnati correttamente all'interno dei gruppi di popolazione. È stato scelto il metodo di assegnazione bayesiano poiché la maggior parte degli studi utilizza questo approccio statistico e ha dimostrato di funzionare meglio dei metodi basati sulla frequenza o sulla distanza (Cornuet et al. 1999; Hansen et al. 2001).

Poiché GENECLASS2 utilizza il metodo jackknifing (leave-one-out) per assegnare campioni alle popolazioni di origine, questo può portare a un bias nell'accuratezza dell'assegnazione perché i "training data" utilizzati nella cross-validation possono risultare identici (viene tolto un solo campione per volta) (James et al. 2013).

Pertanto, è stata eseguita una cross-validation basata sul resampling, con il pacchetto di R AssignPOP (versione 1.1.3; Chen et al. 2018), per stimare l'accuratezza dell'assegnazione e le probabilità di appartenenza, al fine di ridurre possibili errori dovuti a campioni di dimensioni non uguali. Come suggerito da Chen et al. (2018), sono state prima calcolate le probabilità di appartenenza e poi visualizzati come gli individui venivano assegnati alle popolazioni attraverso diagrammi a barre sovrapposti. Quindi abbiamo eseguito un Monte-Carlo resampling con 500 iterazioni, fissando la proporzione di individui training a 0.7 e scegliendo come modello di classificazione il "Linear Discriminant Analysis".

3.2.6 Selezione di SNPs diagnostici

Il passo successivo è stato quello di selezionare un numero ristretto di SNP al fine di ridurre i costi elevati derivanti da metodi di genotipizzazione rapidi e automatizzati. Questo consentirà di studiare le caratteristiche genetiche degli animali sequestrati a costi relativamente contenuti.

Sono stati applicati diversi metodi statistici per creare pannelli di SNP di dimensioni ridotte ma con potenza di assegnazione simile al dataset completo: analisi delle componenti principali (PCA) (Panel_PCA), FST (Panel_FST), random forest (Panel_RF) e due diverse combinazioni dei primi due metodi (Panel_FST_PCA e Panel_PCA_FST). Per tutti i criteri è stato applicato un "approccio a nodi", seguendo le relazioni tra i cluster principali identificati dal grafico ad albero disegnato da fineRADstructure. Per ciascuno dei 7 nodi, sono stati selezionati gli SNP che meglio evidenziavano la divisione tra i due gruppi originati ad ogni nodo.

Sono stati presi in considerazione soltanto gli SNP "tecnicamente tipizzabili", vale a dire quegli SNP che si trovavano tra le posizioni 50 e 149 lungo il locus (i nostri loci avevano una lunghezza di 200 bp), e che quindi avevano una regione fiancheggiante di almeno 50 bp, su entrambi i lati, in modo da poter disegnare i primer. Per ogni approccio, sono stati progettati tre pannelli con un numero diverso di SNP: il più piccolo era composto da 48 SNP, l'intermedio da 96 SNP e il più grande, con il numero massimo di SNP possibile a seconda del metodo di selezione (questi avevano size variabili dovute alle diverse soglie utilizzare per ogni metodo; vedere più avanti). Le prime due size sono state stabilite seguendo le metodiche di alcune tecniche di genotipizzazione di SNP che utilizzano piastre standard da 48 o 96 SNP. Il pannello di dimensioni maggiori è stato invece creato per verificare la precisione che si poteva ottenere conservando tutti i possibili SNPs oltre una certa soglia significativa. In conclusione, sono stati creati e confrontati 15 pannelli (5x3).

Pannello basato su PCA

La prima classe di pannelli è stata creata con la PCA: le componenti principali (PC) sono anche chiamati eigenvector, e poiché rappresentano la varianza totale nella suddivisione dei dati in diversi assi, sommati tutti insieme, i loro valori restituiscono di fatto la varianza originale. In ogni PC, le variabili (SNP) danno un diverso apporto per spiegare l'efficacia di quell'asse nel discriminare gli individui appartenenti a gruppi distinti. Quel contributo è chiamato loading, e più è alto, più lo SNP è importante nel determinare la distribuzione dei punti lungo l'asse. Quindi, se l'eigenvalue della PC1 è sufficientemente alto rispetto alle altre PC, i loading più alti di questo asse dovrebbero essere effettivamente sufficienti a evidenziare le differenze presenti, in modo da consentire quindi di raggruppare gli individui in base alla loro composizione genetica. Sono stati selezionati i loading più elevati dalle PC che spiegavano meglio la suddivisione dei dati ad ogni nodo. Per fare questo, sono stati generati file genepop con il programma POPULATIONS in STACKS, per ogni nodo, impostando il parametro r a 0,75 (cioè solo gli SNP presenti in almeno il 75% di tutti gli individui erano mantenuti nel nuovo file). Successivamente, con il pacchetto di R ADEGENET v2.1.1 (Jombart 2008; Jombart and Ahmed 2011) sono stati eseguite le PCA ad ogni nodo da analizzare, mantenendo sempre le prime 10 PC per iniziare a scremare la quantità di dati e allo stesso tempo assicurarsi di mantenere la maggior parte della varianza originale. Quindi le PC1 e PC2 venivano visualizzate su un grafico a dispersione per esaminare la distribuzione dei dati. Se la PC1 risultava essere l'asse cruciale per dividere i due cladi, l'analisi continuava solo considerando questa componente, altrimenti venivano

valutate sia la PC1 che la PC2. Infine, sono stati calcolati i loading di ciascuno dei due alleli ad ogni SNP e impostata la soglia a 0,95 per ritenere l'ultimo 5% che includeva tutti i loading più elevati. Gli SNP con i valori più alti sono stati usati per assemblare i primi tre pannelli di dimensioni crescenti.

Pannello basato su Fst

La seconda classe di pannelli è stata creata calcolando i valori di FST (indice di fissazione) a coppie ad ogni nodo tra i due cladi, e quindi salvando tutti gli SNP con il punteggio più alto possibile. Questo approccio, basato su una misura della differenziazione della popolazione, ha una lunga tradizione nelle applicazioni alla ricerca ecologica (Karlsson et al. 2007; André et al. 2016). L'indice di fissazione varia tra 0, quando entrambe le sottopopolazioni condividono le stesse frequenze alleliche in un locus, e 1, quando gli alleli alternativi si sono effettivamente fissati nell'una o nell'altra sottopopolazione. La selezione di SNP con valori di FST alti dovrebbe garantire una divisione marcata tra due gruppi distinti. Genepop v4.7.0 (Rousset 2008) è stato utilizzato per calcolare i valori di FST a coppie ad ogni nodo. Gli SNP quindi sono stati classificati in base al loro valore in modo da selezionare quelli migliori e creare tre pannelli con un numero crescente di SNP.

Pannelli mix PCA-Fst

Questi tipi di pannelli sono stati ottenuti unendo le informazioni provenienti dai primi due metodi, al fine di vedere se una combinazione di essi potesse preservare alcune caratteristiche cruciali nell'identificazione della struttura genetica dell'intero dataset. Quindi, una classe di pannelli è stata creata con gli SNP con i valori FST più alti che erano anche presenti nel primo 5% di loading più elevati. L'altro tipo di pannello, invece, è stato ottenuto scegliendo gli SNP con i loading più alti e con un corrispondente valore di FST superiore a 0,05 (valori più piccoli sono generalmente considerati come segnale di bassa differenziazione genetica) (Hartl and Clark 1997). Entrambe queste due classi di pannelli di SNP erano formate da 48 SNP per il più piccolo, da 96 SNP per l'intermedio e dal numero massimo di SNP che i rispettivi criteri permettevano di selezionare.

Pannello basato su Random Forest

Inoltre è stato applicato un approccio di apprendimento automatico chiamato Random Forest (RF) (Breiman 2001). Questo metodo di classificazione costruisce una serie di alberi decisionali considerando un sottoinsieme di variabili predittive (ad esempio SNP) su ciascun nodo. Più specificamente, una "foresta" di alberi decisionali (da migliaia a centinaia di migliaia) viene coltivata per classificare un gruppo di individui in categorie conosciute dai valori che mostrano a ogni variabile considerata. Questo metodo consente quindi di identificare un numero limitato di caratteristiche (ad es. SNP) che classificano al meglio le osservazioni nei gruppi precedenti (ad es. le popolazioni sorgente) calcolando la riduzione media in accuratezza (MDA), ovvero quanto male il modello classifica le osservazioni quando si rimuove una caratteristica alla volta. Valori di MDA superiori significano che quella determinata caratteristica è importante per il modello. L'errore out-of-bag (OOB) invece è come RF classifica le misure errate. È la media dell'errore di predizione di un sottocampione "training" ricampionato su tutti gli alberi. Il pacchetto di R randomForest (Liaw and Wiener 2002) è stato utilizzato per questo tipo di analisi. Seguendo l'approccio dei nodi come per i metodi precedenti, il parametro ntree (numero di alberi) è stato determinato eseguendo RF con 100, 500, 1.000, 8.000, 25.000 alberi per sei volte ciascuno. Il parametro mtry (numero di caratteristiche considerate ad ogni nodo) è stato testato usando la funzione tuneRF. RF è stato quindi eseguito 10 volte per nodo, come suggerito da Sylvester et al. (2018), e l'MDA calcolato ed valutato ad ogni sessione. Sono stati selezionati solo quegli SNP elencati in tutte le 10 esecuzioni per nodo con $MDA > 1$; infine sono stati creati tre pannelli che contenevano gli SNP con l'MDA più alto.

Infine, tre diagrammi di Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) sono stati creati per visualizzare la sovrapposizione degli SNP selezionati in tutti i metodi all'interno di ciascuna delle tre size (48, 96, MaxSNP) dei pannelli.

3.2.7 Validazione dei pannelli SNP

Sono stati eseguiti test di self-assignment per confrontare i cinque pannelli (per ogni size) in termini di accuratezza dell'assegnazione. I test di assegnazione sono stati eseguiti utilizzando i software GENECLASS 2.0 (Piry et al. 2004) e AssignPop. Le accuratezze nell'assegnazione dei quindici pannelli sono state calcolate attraverso 500 iterazioni di Monte-Carlo con 0,7 come proporzione di individui training e la Linear Discriminant

Analysis come modello di classificazione per il rendimento migliore che abbiamo ottenuto con i nostri dati utilizzando AssignPop.

Successivamente sono state confrontate le performance dei pannelli con un test ANOVA a due vie, per verificare se ci fossero differenze significative tra l'accuratezza di assegnazione media tra le diverse dimensioni dei pannelli (tenendo conto di tutti i metodi insieme) e tra i metodi di selezione degli SNPs (considerando congiuntamente le tre dimensioni dei pannelli). Quando il test ha portato a differenze significative, è stato applicato il test Tukey Honestly Significant Difference (HSD) per scoprire quali confronti a coppie erano responsabili delle differenze ottenute con l'ANOVA.

3.3 Risultati

3.3.1 Struttura di popolazione e analisi di diversità con STR

L'analisi di STRUCTURE indicava che $K = 2$ e $K = 6$ erano i K più supportati, calcolati seguendo il metodo di Evanno (vedere Fig. 2, capitolo 1). Il $K = 6$ indicava una suddivisione di *T. h. boettgeri* in 2 gruppi, Grecia (GRE) e Bosco Mesola con Croazia e Macedonia (MCM). Inoltre, abbiamo trovato una suddivisione di *T. h. hermanni* in 4 gruppi, la penisola italiana (ITP), la Francia continentale (FRA), la Calabria (CAL) e le isole del Mediterraneo insieme alla Spagna (ISS) (vedere Fig. 3, capitolo 1).

Tutte le ulteriori analisi sono state eseguite sui sei clusters genetici rilevati da STRUCTURE. In totale abbiamo ottenuto 114 alleli per i 7 loci nell'intero dataset (461 campioni). Il numero di alleli per locus microsatellite variava da 3 a 31 alleli. I valori F_{ST} globali avevano valori simili quando calcolati con e senza correzione per gli alleli nulli quindi abbiamo deciso di mantenere i genotipi originali. La stima degli indici di diversità genetica (AR, AP, Fis, Ho, He) è presente in Tabella 1. Gli alleli privati per popolazione variavano da 1 a 16 mentre la ricchezza allelica media per popolazione variava tra 2,98 e 7,88.

Tabella 1. Caratterizzazione della diversità genetica dei loci STR per ogni cluster ottenuto con STRUCTURE: dimensione della popolazione (N), numero di alleli (Na), ricchezza allelica (Ar), alleli privati (Pa), eterozigosità osservata (Ho), eterozigosità attesa (He). GRE = Grecia; MCM = Mesola, Croazia e Macedonia; ITP = Italian Peninsulare; CAL = Calabria; ISS = Isole Mediterranee e Spagna; FRA = Francia.

	N	Na	Ar	Pa	Ho	He
GRE	77	45	5.05	3	0.34	0.37
MCM	56	39	5.09	1	0.37	0.48
ITC	115	73	7.22	16	0.46	0.58
CAL	38	50	7.14	8	0.56	0.57
ISS	86	66	7.88	11	0.49	0.57
FRA	83	24	2.98	1	0.26	0.32
Globale	454	49.5	5.89	6.67	0.41	0.48

Gli FST a coppie tra i 2 cluster orientali mostravano un valore elevato ($F_{ST} = 0,31$) (Fig. 2). Inoltre erano sempre più alti i valori quando venivano confrontati i gruppi occidentali con GRE, rispetto a MCM. All'interno delle popolazioni occidentali i valori di FST variavano da 0,14 tra ITP e ISS, e ISS e CAL a 0,39 tra CAL e FRA. Da notare che quest'ultimo valore è molto più alto rispetto agli altri confronti tra i gruppi occidentali. Il test di differenziazione con permutazioni mostrava che tutti i valori FST erano significativamente più grandi di zero ($p \leq 0,01$), indicando quindi che tutte le popolazioni erano molto ben differenziate.

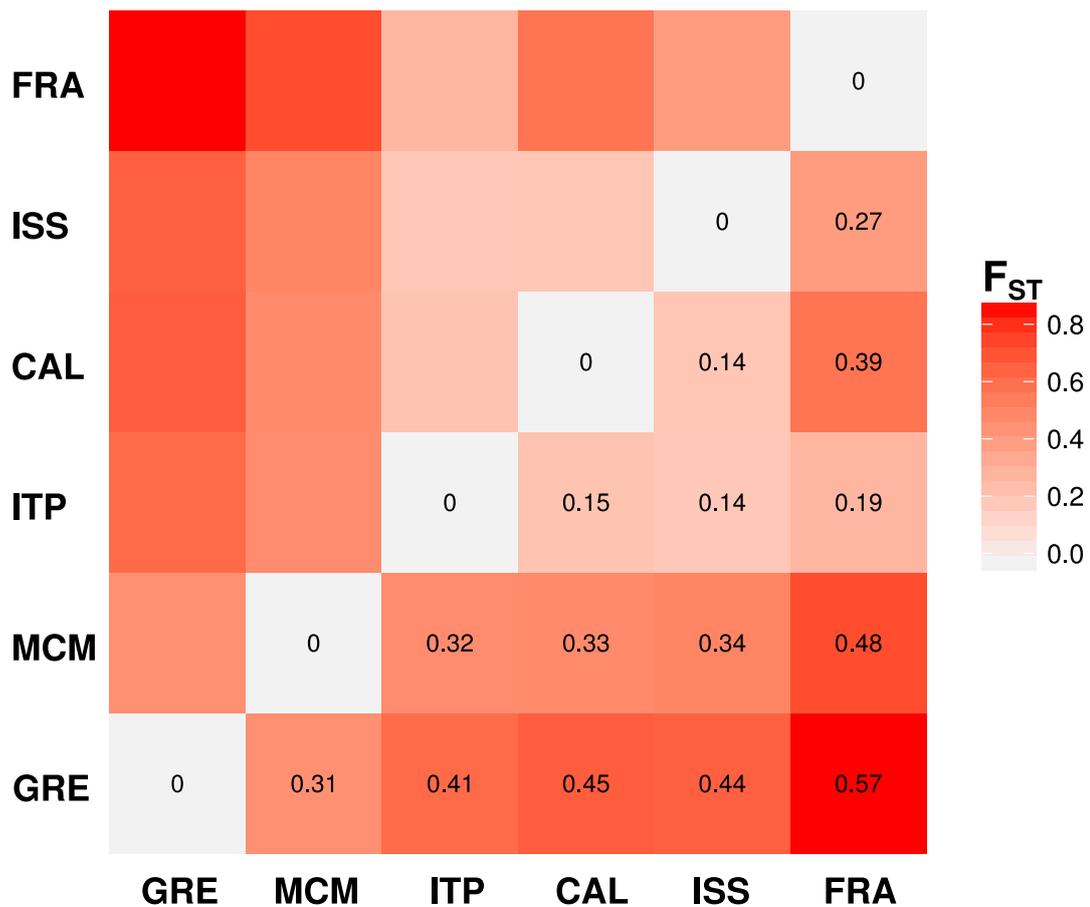


Figura 2. Valori F_{ST} calcolati sul dataset STR. GRE = Grecia; MCM = Mesola, Croazia e Macedonia; ITP = Italian Peninsulare; CAL = Calabria; ISS = Isole Mediterranee e Spagna; FRA = Francia.

3.3.2 Filtering dati ddRADseq e analisi di struttura di popolazione

Degli 84 soggetti sequenziati, sono stati esclusi cinque campioni a causa dello scarso coverage e dei dati mancanti. Il coverage medio del sequenziamento ottenuto per individuo variava da 89,897 a 807,514 (analisi *de novo*) con una media di 248.312 reads per campione.

Dopo aver filtrato i dati grezzi provenienti dal ddRADseq, è stata eseguita la pipeline *de novo* su 79 campioni ottenendo 10.380 loci. Il modulo POPULATION di STACKS ha permesso di selezionare i loci presenti in almeno il 75% degli individui e ottenendo 3.188 SNPs finali.

FineRADstructure è stato utilizzato per generare una matrice di co-ancestry e un cladogramma, che suddivideva il nostro dataset in otto diverse popolazioni (Fig. 3, 4). Dopo la prima analisi, sono stati rimossi quattro campioni perché mostravano un genotipo ibrido e altri cinque in quanto parte di piccole popolazioni di campionamento (<2) (Spagna e Francia).

Nel primo caso la rimozione ha permesso di ottenere un dataset di riferimento *wild* non influenzato da possibili rilasci e sequestri che potrebbero aver portato alle ibridazioni. Nel secondo caso la rimozione di individui non è probabilmente rilevante, per i pannelli di identificazione di animali introdotti illegalmente, perché Spagna e Francia non sono luoghi tipici di esportazione. Tutte le ulteriori analisi quindi sono state eseguite sui 70 campioni. I livelli più bassi di co-ancestry sono stati ottenuti tra le due sottospecie. All'interno delle sottospecie è stato possibile rilevare una struttura anche tra aree geografiche vicine e tra aree che non eravamo in grado di distinguere geneticamente utilizzando loci STR (vedi capitolo 1). In *T. h. hermanni* erano presenti sei gruppi distinti (ITP, CAN, CAC, CAS, SIC, SAR) che condividevano una bassa media generale di co-ancestry con i picchi più alti tra ITP e CAN, e SIC e SAR, cluster non distinguibili con STR (vedere capitolo 1). Tra le due popolazioni della sottospecie orientale (GRE, MEC) abbiamo ottenuto i valori medi più alti di co-ancestry.

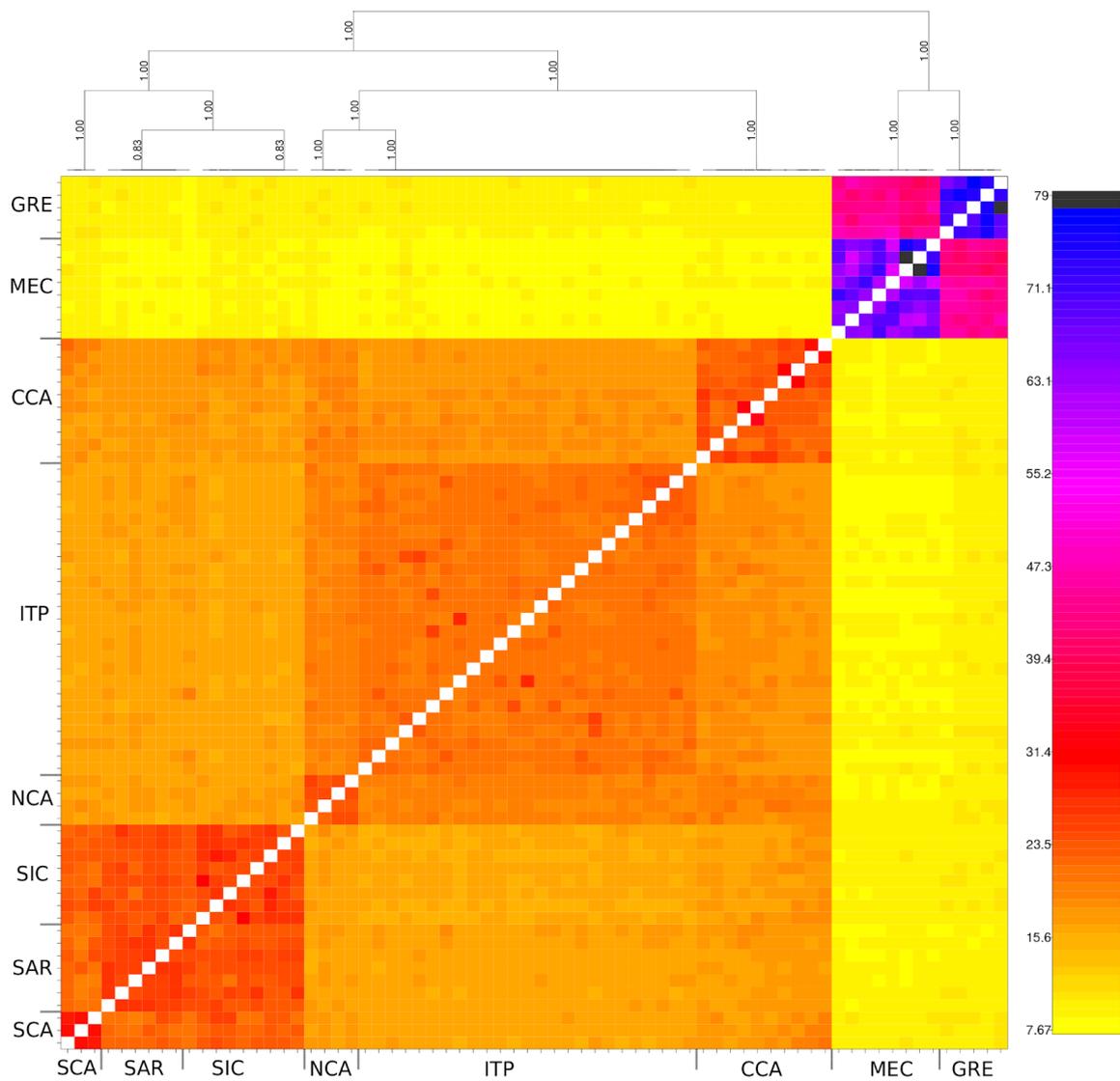


Figura 3. Matrice di co-ancestry ottenuta con fineRADstructure. I più alti livelli di co-ancestry sono indicati in nero/porpora mentre i livelli più bassi in giallo. GRE = Grecia; MEC = Mesola e Croazia; ITP = Italia Peninsulare; NCA = Nord Calabria; CCA = Centro Calabria; SCA = Sud Calabria; SIC = Sicilia; SAR = Sardegna.

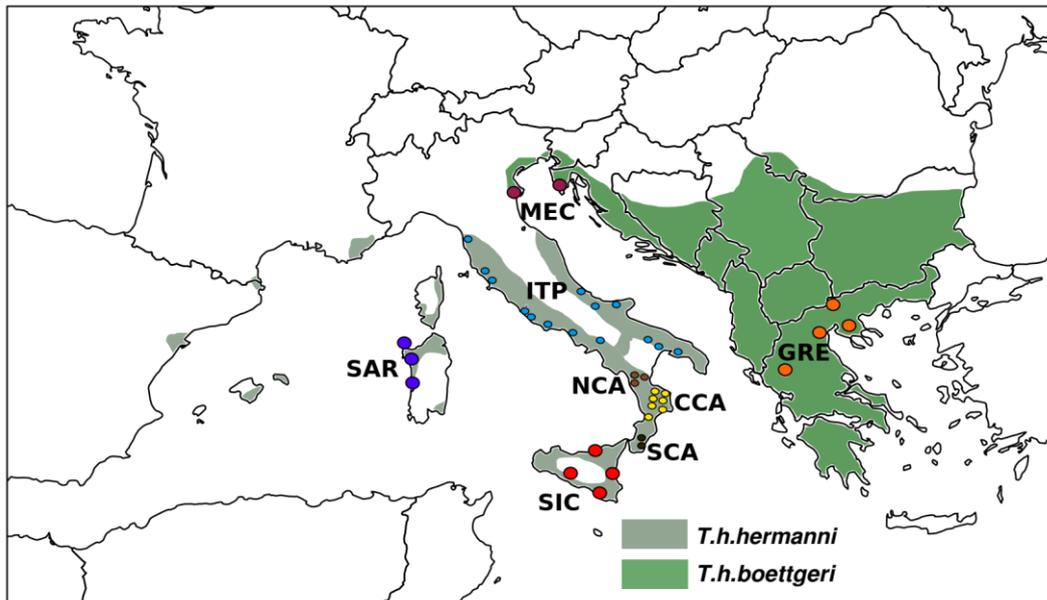


Figura 4. Località di campionamento degli individui utilizzati per il ddRADseq e assegnazione al cluster basata su analisi di co-ancestry svolta con fineRADstructure. GRE = Grecia; MEC = Mesola e Croazia; ITP = Italia Peninsulare; NCA = Nord Calabria; CCA = Centro Calabria; SCA = Sud Calabria; SIC = Sicilia; SAR = Sardegna.

Tutte le ulteriori analisi sono state eseguite sugli otto gruppi genetici e geografici rilevati da fineRADstructure.

Le stime di F_{ST} (Fig. 5) tra le popolazioni della sottospecie occidentale variavano da 0,06 tra la Sicilia e la Sardegna, a 0,34 tra la penisola italiana e il sud della Calabria e la Sardegna rispettivamente. Tra le due popolazioni della sottospecie orientale il valore di F_{ST} era il più alto tra tutti i confronti intra subspecifici ($F_{ST} = 0,35$). Tutti i confronti erano altamente significativi ($P < 0,05$).

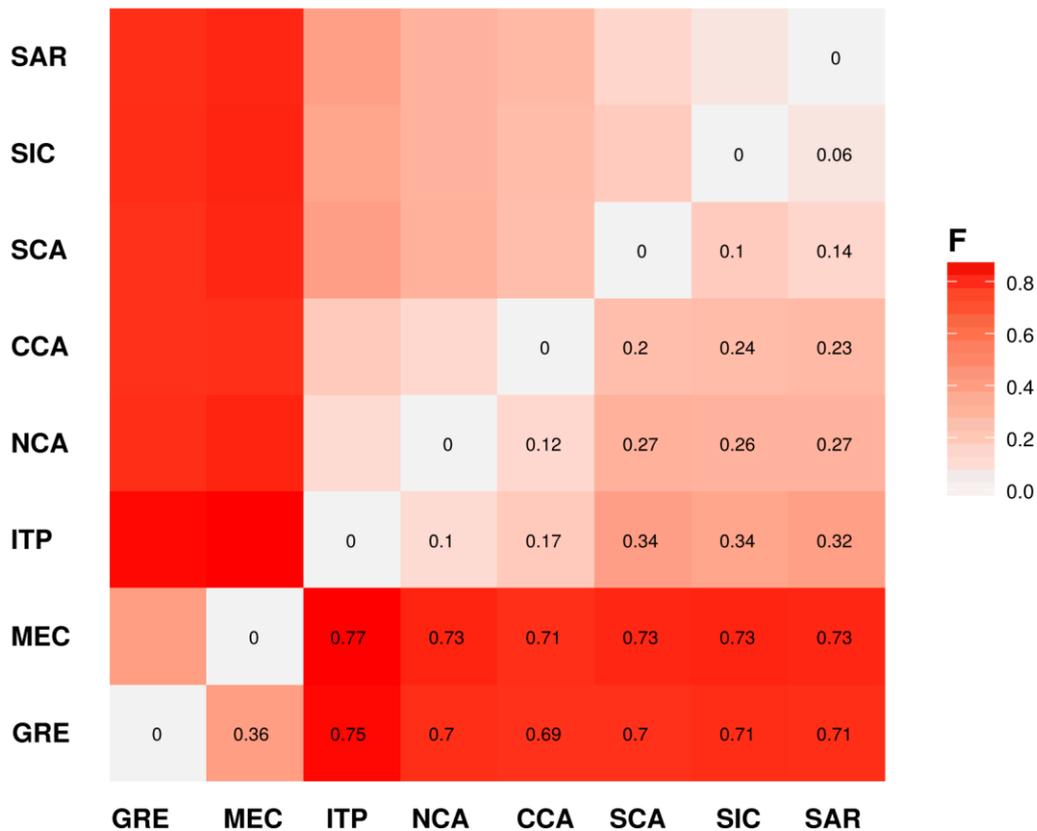


Figura 5. Valori FST calcolati sul dataset ddRADseq. GRE = Grecia; MEC = Mesola e Croazia; ITP = Italia Peninsulare; NCA = Nord Calabria; CCA = Centro Calabria; SCA = Sud Calabria; SIC = Sicilia; SAR = Sardegna.

L'eterozigosi osservata media (HO) e quella attesa (HE) sono state calcolate per gli otto cluster genetici utilizzando tutti i loci (Tab. 2). Rispettivamente, gli intervalli andavano da 0,071 a 0,096 e da 0,081 a 0,108. I coefficienti di inbreeding (FIS) erano bassi in ciascun cluster, compresi tra 0,025 in NCA e 0,073 in CCA (Tab.).

Tabella 2. Caratterizzazione della diversità genetica dei loci ddRAD per ogni cluster ottenuto con fineRADstructure: dimensione del campione per popolazione (N), ricchezza allelica (Ar), alleli privati (Pa), eterozigosità osservata (Ho), eterozigosità attesa (He). GRE = Grecia; MEC = Mesola e Croazia; ITP = Italia Peninsulare; NCA = Nord Calabria; CCA = Centro Calabria; SCA = Sud Calabria; SIC = Sicilia; SAR = Sardegna.

	N	Ar	Pa	Ho	He
GRE	8	1.19	544	0.09	0.09
MEC	5	1.16	231	0.08	0.07
ITP	25	1.15	164	0.07	0.08
NCA	4	1.18	60	0.09	0.09
CCA	10	1.20	205	0.09	0.10
SCA	3	1.18	41	0.08	0.06
SIC	8	1.19	97	0.09	0.09
SAR	7	1.19	39	0.09	0.08
Globale	70	1.18	172.62	0.08	0.08

3.3.3 Confronto tra STR e ddRADseq

I risultati complessivi sul confronto tra i due dataset, STR2 (298 campioni, 7 loci) e ddRADseq (70 campioni, 3188 loci), mostravano in generale una concordanza ma con alcune discrepanze.

Sono state riscontrate leggere differenze sui livelli di eterozigosi e differenze più marcate sulla discriminazione degli 8 cluster da parte della PCA.

La correlazione degli FST a coppie era significativamente positiva anche se i livelli medi degli FST erano più alti in ddRADseq rispetto a STR2 (FST globale; ddRADseq = 0.43; STR2 = 0.27) (Fig. 6, 7). Per quanto riguarda invece l'eterozigosità e il coefficiente di inbreeding questi mostravano una correlazione positiva ma di poco non significativa nel primo caso e significativa nel secondo (Tab. 3; Fig. 8, 9).

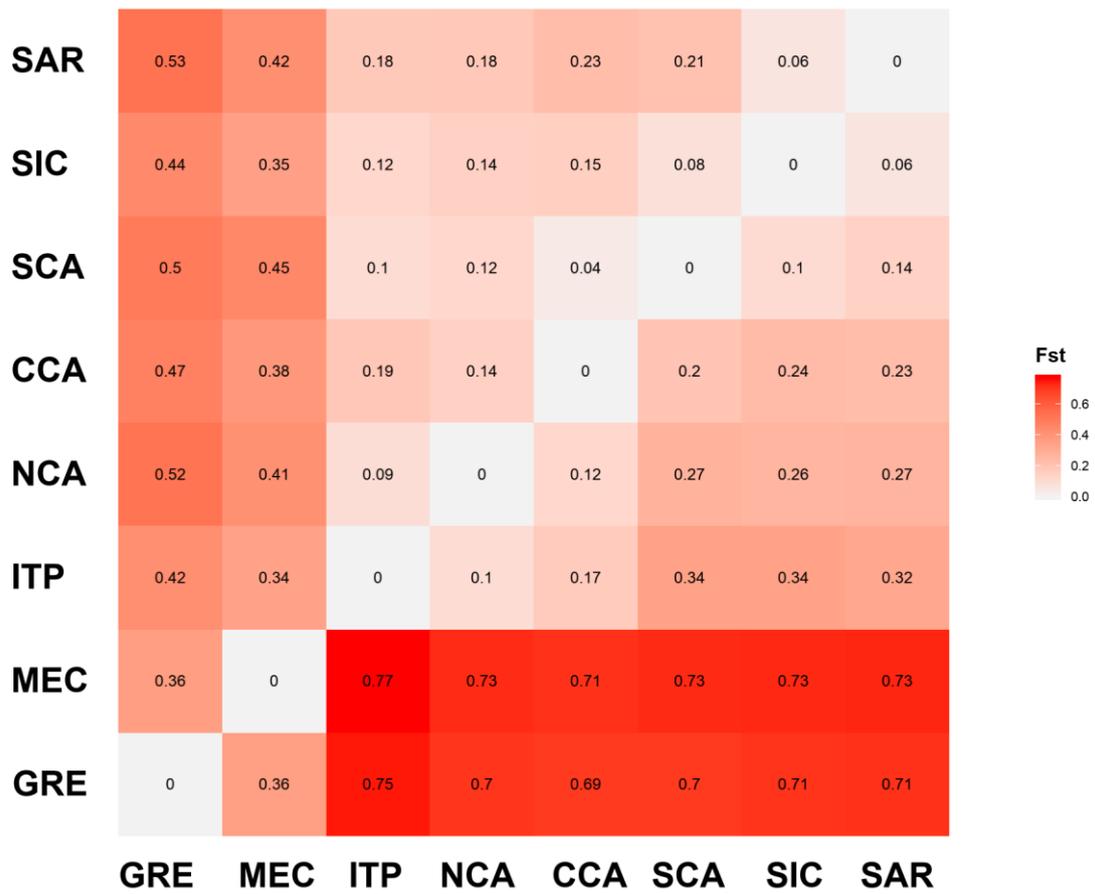


Figura 6. Valori FST calcolati sul dataset ddRADseq (sotto la diagonale) e sul dataset STR2 (sopra la diagonale). GRE = Grecia; MEC = Mesola e Croazia; ITP = Italia Peninsulare; NCA = Nord Calabria; CCA = Centro Calabria; SCA = Sud Calabria; SIC = Sicilia; SAR = Sardegna.

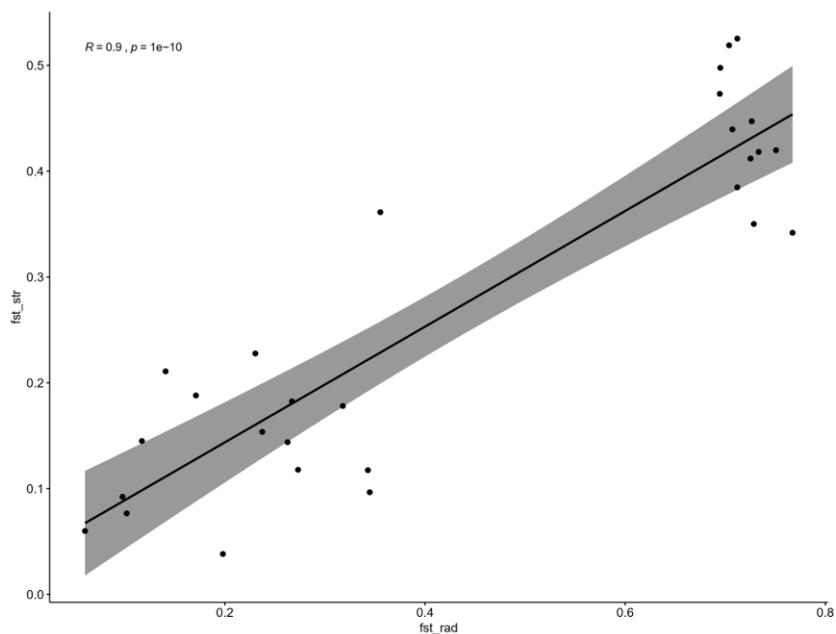


Figura 7. Correlazione tra i valori di FST a coppie calcolati sugli 8 clusters nel dataset ddRADseq (sulle ascisse) e il dataset STR2 (sulle ordinate). $R = 0.9$; $p = 1e-10$.

Tabella 3. Caratterizzazione della diversità genetica nei dataset STR2 (sulla sinistra) e ddRADseq (sulla destra) per ogni cluster: dimensione del campione per popolazione (N), eterozigosità osservata (Ho), eterozigosità attesa (He), coefficiente di inbreeding (Fis). GRE = Grecia; MEC = Mesola e Croazia; ITP = Italia Peninsulare; NCA = Nord Calabria; CCA = Centro Calabria; SCA = Sud Calabria; SIC = Sicilia; SAR = Sardegna.

	<i>STR2</i>				<i>ddRADseq</i>			
	N	Ho	He	Fis	N	Ho	He	Fis
GRE	77	0.34	0.37	0.06	8	0.09	0.09	0.00
MEC	47	0.35	0.42	0.16	5	0.08	0.07	-0.14
ITP	91	0.44	0.57	0.22	25	0.07	0.08	0.12
NCA	13	0.5	0.56	0.13	4	0.09	0.09	0.00
CCA	21	0.51	0.54	0.06	10	0.09	0.10	0.10
SCA	3	0.48	0.35	-0.33	3	0.08	0.06	-0.33
SIC	22	0.5	0.6	0.22	8	0.09	0.09	0.00
SAR	24	0.56	0.53	-0.09	7	0.09	0.08	-0.12
Globale	298	0.46	0.49	0.05	70	0.08	0.08	0.00

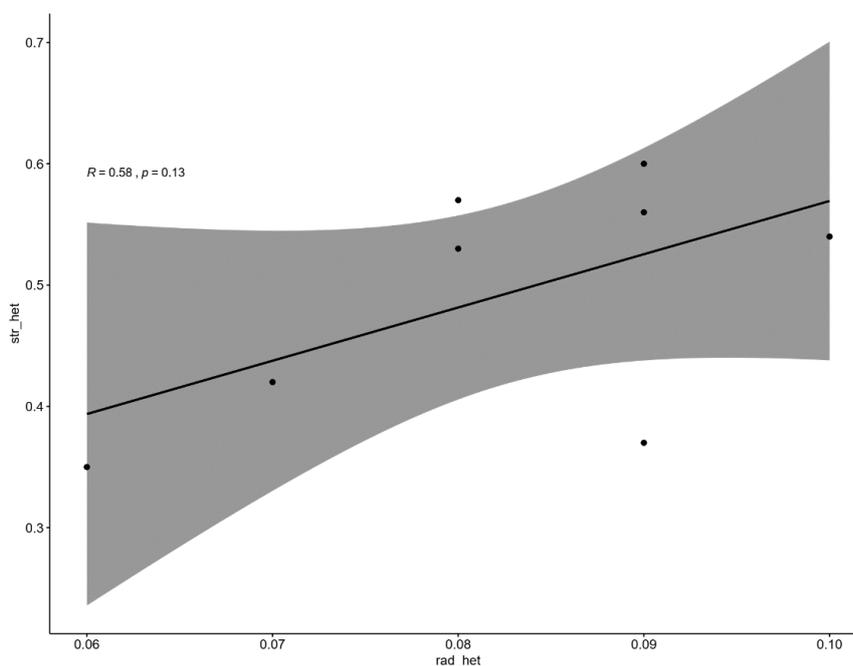


Figura 8. Correlazione tra le eterozigosità attese calcolate negli 8 clusters sul dataset ddRADseq (sulle ascisse) e il dataset STR2 (sulle ordinate). $R = 0.58$; $p = 0.13$.

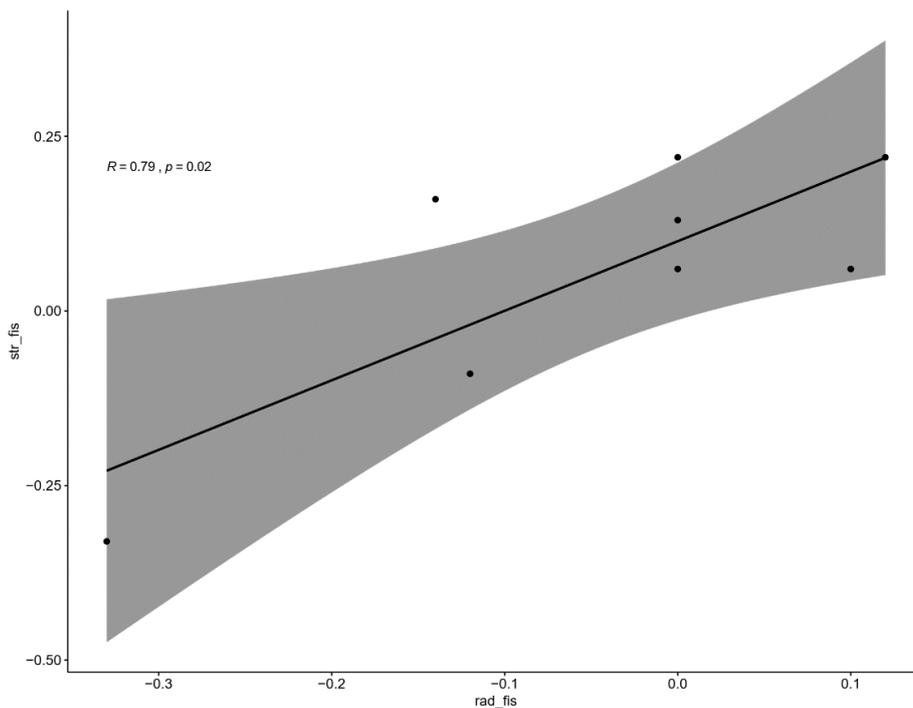


Figura 9. Correlazione tra gli indici Fis calcolati sugli 8 clusters nel dataset ddRADseq (sulle ascisse) e il dataset STR2 (sulle ordinate). $R = 0.79$; $p = 0.02$.

La PCA in STR2 suddivideva le due sottospecie e i 2 cluster orientali, ma non era in grado di risolvere la sottostruttura presente nelle popolazioni occidentali (Fig. 10b). Nella PCA con solo individui della sottospecie occidentale (Fig. 10d) si aveva un'ampia sovrapposizione tra campioni di diverse aree geografiche. Le due sottospecie, nella PCA con ddRADseq, erano molto più distinte (Fig. 10a). Quando veniva considerato tutto il dataset ddRADseq era presente una leggera sovrapposizione tra i 2 cluster orientali e una netta divisione, lungo la seconda componente principale, all'interno delle popolazioni occidentali. I cluster ITP, NCA e CCA erano nettamente separati dai cluster SCA, SIC e SAR. La PCA, con gli esemplari della sottospecie occidentale (Fig. 10c), confermava e aumentava questa differenziazione, ma mostrava anche una non completa separazione tra i cluster SIC e SAR.

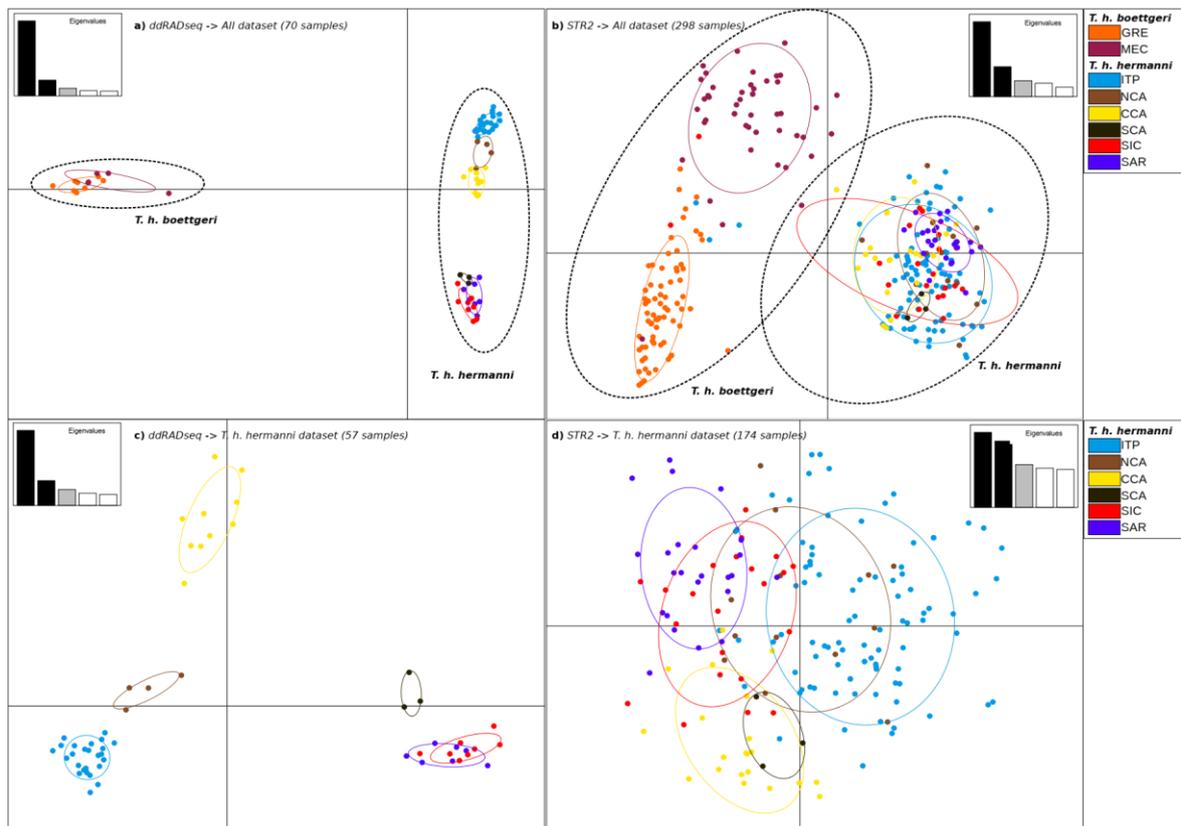


Figura 10. Confronto dell'analisi delle componenti principali (PCA) utilizzando i dataset completi (a) ddRADseq, e (b) STR2; e i dataset *T. h. hermanni* (c) ddRADseq e (d) STR2. Otto clusters definiti a priori con l'analisi di co-ancestry (fineRADstructure). GRE = Grecia; MEC = Bosco Mesola e Croazia; ITP = Italia Peninsulare; NCA = Nord Calabria; CCA = Centro Calabria; SCA = Sud Calabria; SIC = Sicilia; SAR = Sardegna.

3.3.4 Performance del pannello STR

Un'analisi di self-assignment sul pannello di 7 loci STR è stata eseguita con GENECLASS2. Il valore medio di assegnazione del test era del 96,5%.

Abbiamo anche eseguito un test di self-assignment con AssignPOP. La percentuale media di assegnazione, con una proporzione di individui considerati training di 0,7 e con 500 ripetizioni di ricampionamento casuale Monte-Carlo, era del 46,8%.

3.3.5 Performance dei pannelli di SNP

Sono stati applicati tre diversi metodi e due combinazioni di due di essi per ridurre i migliaia di SNP del dataset originale a un piccolo numero di loci informativi, creando cinque classi di pannelli SNP. Ogni classe era composta da tre pannelli di dimensioni crescenti: 48 SNP, 96 SNP e il numero massimo di SNP per criterio di selezione (MaxSNP). I nomi dei pannelli, i metodi di selezione degli SNP e le dimensioni per metodo sono riassunti nella Tabella 4.

Ogni approccio è stato applicato ad ogni singolo nodo mostrato nella Figura 11, quindi sono stati creati i pannelli selezionando ad ogni nodo numeri comparabili di SNP.

Tabella 4. Descrizione dei pannelli per ogni metodo di selezione degli SNPs e relative dimensioni.

Nome	Metodo	Dimensione
Panel_PCA	SNPs con loadings compresi nel primo 5% delle componenti principali più informative	48, 96, 127
Panel_Fst	SNPs con il massimo valore di Fst	48, 96, 180
Panel_Fst_PCA	SNPs con i valori di FST più alti che erano anche presenti nel primo 5% di loadings della PCA	48, 96, 144
Panel_PCA_Fst	SNPs con loadings più elevati dell'ultimo quinto percentile ma che avevano anche valori di Fst più alti	48, 96, 131
Panel_RF	SNPs con il “Mean Decrease in Accuracy” più elevato	48, 96, 158

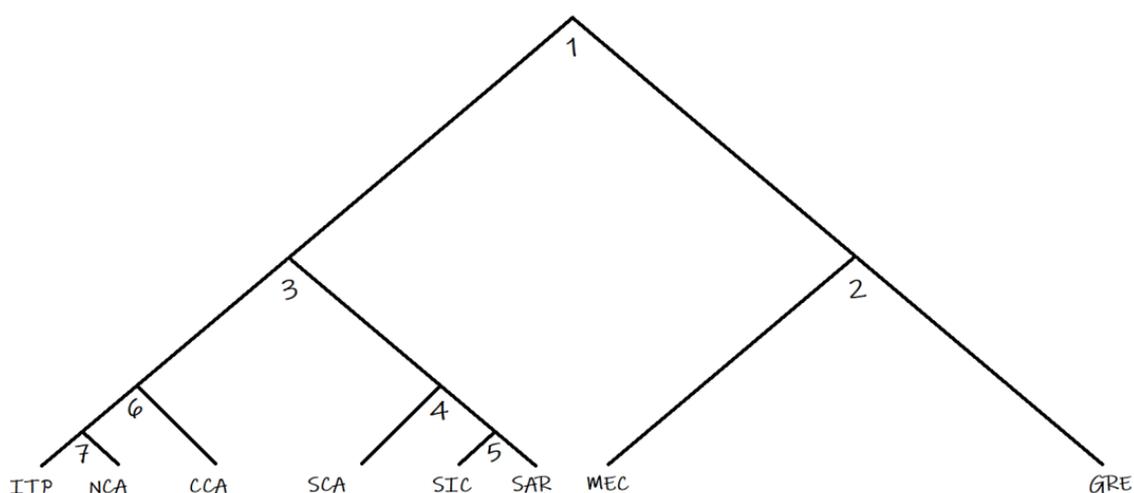


Figura 11. Relazioni genetiche tra i cluster identificate con fineRADstructure basate sulla co-ancestry. I numeri da 1 a 7 indicano l'ordine seguito durante i test di selezione SNP su ciascun nodo. GRE = Grecia; MEC = Mesola e Croazia; ITP = Italia Penisola; NCA = Calabria settentrionale; CCA = Calabria Centrale; SCA = Calabria meridionale; SIC = Sicilia; SAR = Sardegna.

Pannello basato su PCA

Dopo aver eseguito ogni PCA, è stata controllata la distribuzione delle PC1 e PC2 dei due cladi da comparare per vedere quale asse discriminasse meglio i due gruppi. La PC1 risultava efficace nel separare gli individui appartenenti ai cladi alternativi per ciascuno dei sette nodi, quindi sono stati presi in considerazione sempre i loading di quella componente. Sono stati selezionati numeri comparabili di SNP con loading che erano compresi nel primo 5% della PC1 ad ogni nodo per creare tre pannelli (Panel_PCA) di 48, 96 e 127 SNP.

Pannello basato su FST

Dopo aver classificato tutti gli SNP per i loro valori di FST, sono stati creati tre pannelli di 48, 96 e 180 SNP. Per il pannello più grande è stato scelto di tenere un massimo di 180 SNP per avere una grandezza comparabile con gli altri metodi. Non tutti i nodi, tuttavia, erano caratterizzati da alti valori di FST: gli SNP selezionati per il nodo 5, che separa i cluster SIC-SAR, avevano 0,56 come valore più alto. Gli SNP selezionati per il nodo 1 invece erano tutti fissati per uno o per l'allele alternativo tra le due sottospecie (tutti gli FST = 1); gli SNP selezionati per i nodi 2 e 4 avevano alcuni alleli fissati (11 e 2 rispettivamente); infine, i primi SNP classificati per i nodi 3, 6, 7 avevano come valore maggiore 0,91, 0,90 e 0,86 rispettivamente. I valori di FST più bassi per pannello erano 0,39 per il più piccolo, 0,33 per l'intermedio e 0,23 per il più grande.

Pannelli mix PCA-Fst

La terza e quarta classe di pannelli sono stati creati mescolando le informazioni provenienti dalle analisi PCA ed FST. La terza classe di pannelli consisteva di 48, 96 e 144 SNP con valori FST compresi tra 1 e 0,39, da 1 a 0,08 e da 1 a 0,08 rispettivamente. Nel quarto tipo di pannelli i valori degli FST variavano da 1 a 0,38 nel pannello più piccolo (48 SNP), da 1 a 0,08 in quello intermedio (96 SNP) e da 1 a 0,08 per quello più grande (131 SNP). A causa del numero estremamente ridotto di SNP che potevano essere selezionati in base a questi criteri, i nodi 4 e 5 non erano rappresentati ugualmente rispetto agli altri.

Pannello basato su Random Forest

Per ogni nodo, dopo aver ottenuto i loci elencati in tutte le dieci esecuzioni per nodo, sono stati selezionati gli SNP più importanti per determinare la classificazione in uno dei due cladi

da confrontare, ovvero gli SNP con l'MDA più elevato. I pannelli erano composti da 48 SNP, 96 SNP e 158 SNP; il nodo 4 comprendeva solo sei loci per tutte le dimensioni dei pannelli.

I diagrammi di Venn hanno permesso di visualizzare sovrapposizioni e unicità tra i diversi pannelli con le stesse dimensioni (Fig. 12): tra i pannelli con 48 SNPs, il numero di SNPs condivisi tra tutti e 5 i differenti metodi utilizzati era 7, mentre erano 35 per i pannelli con 96 SNPs e 49 per i pannelli MaxSNP. I pannelli costruiti con Random Forest e FST erano sempre quelli che mostravano il più alto numero di SNPs unici (rispettivamente 24 e 15 per il pannello più piccolo, 27 e 23 per quello intermedio, 48 e 63 per quello di dimensioni maggiori).

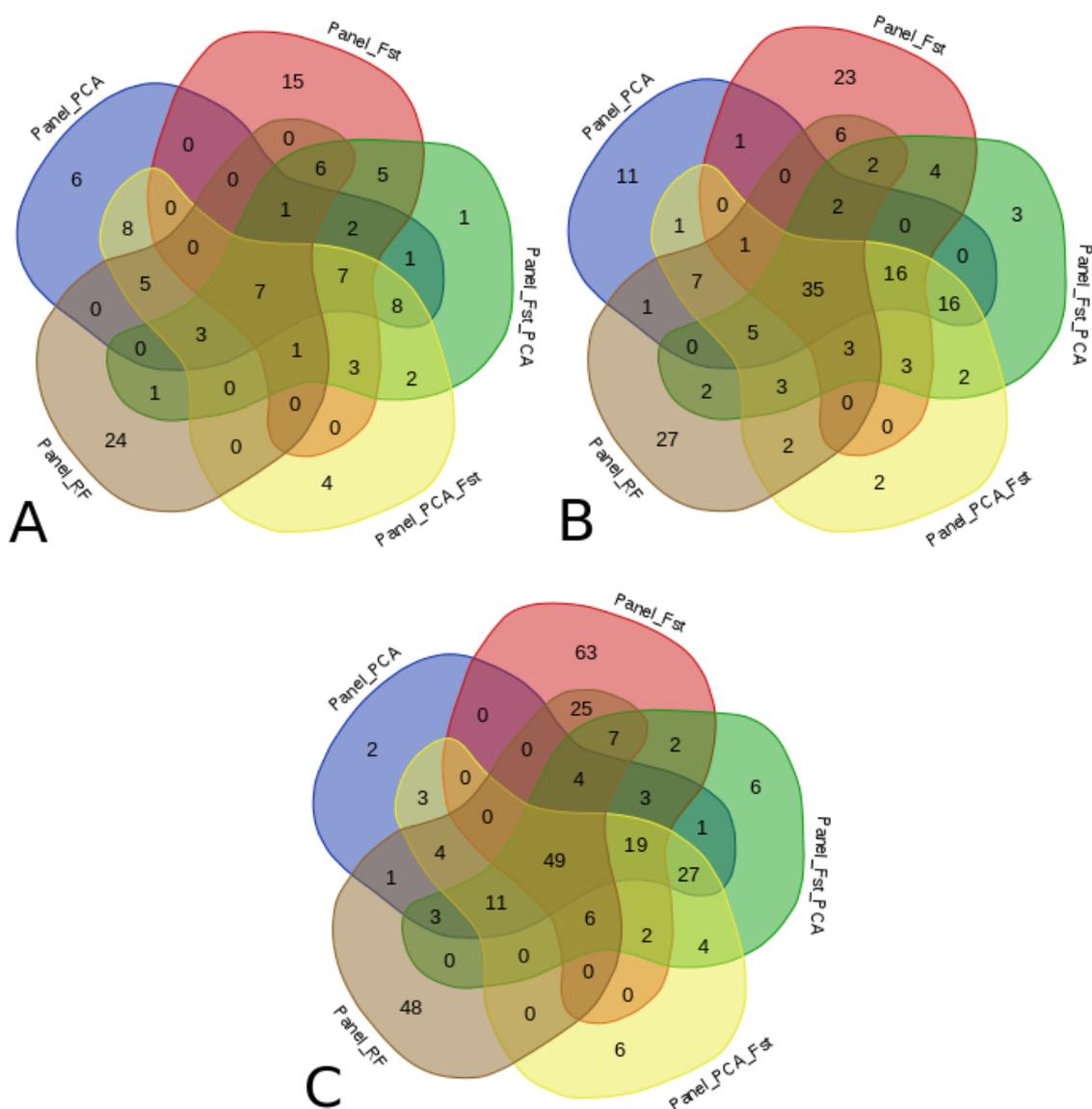


Figura 12. Diagrammi di Venn mostrano overlapping e unicità di SNPs tra i pannelli ad ogni dimensione (A = 48 SNPs, B = 96 SNPs, C = MaxSNPs).

I test di self-assignment sono stati eseguiti prima di tutto con GENECLASS2 (Fig. 13). Le percentuali di individui assegnati correttamente erano molto alte con un range che andava dal 94.3% per il Panel_PCA con 48 SNP al 100% per i Panel_FST e Panel_RF con il numero massimo di SNP.

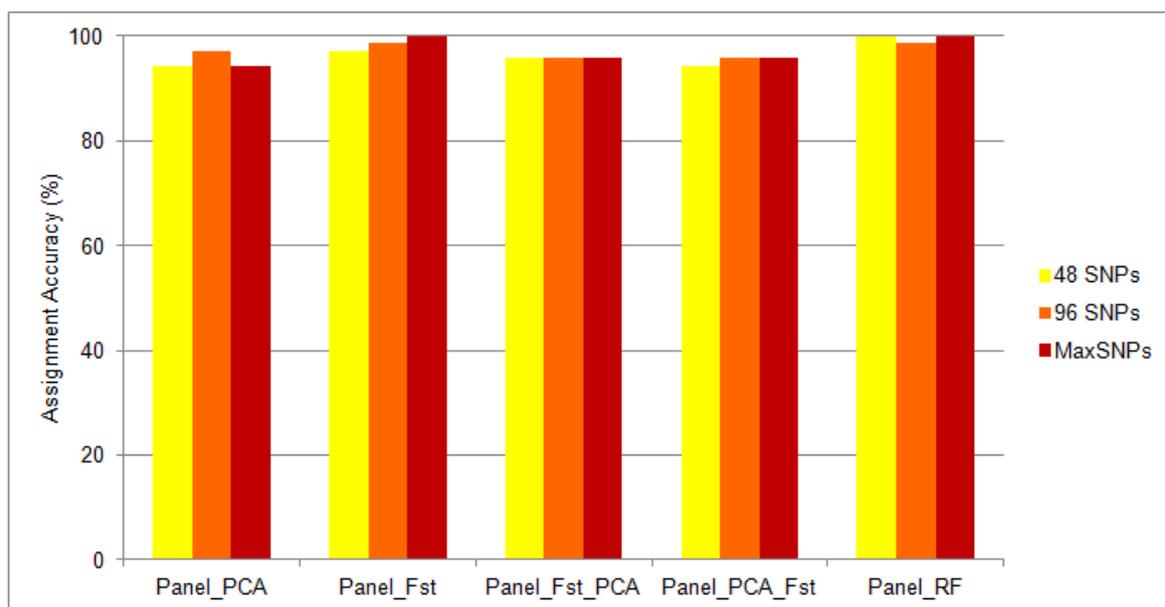


Figura 13. Media della precisione di assegnazione (in %) per tutte le classi e le dimensioni dei pannelli. Le medie sono state stimate con test di assegnazione svolti con GeneClass con il metodo jackknifing.

I punteggi medi dei test di self-assignment eseguiti con AssignPOP, utilizzando 0.7 come proporzione di individui “training” e 500 ripetizioni Monte-Carlo, sono stati (Fig. 14; Tab. 5):

- Panel_PCA con 75.5%, 94.0% e 92.1% per i pannelli 48, 96 e 127 rispettivamente;
- Panel_FST con 83.2%, 88.5% e 96.9% per 48, 96 e 180 SNPs selezionati;
- Panel_FST_PCA con 76.6%, 91.5% e 91.8% per i pannelli 48, 96 e 144 rispettivamente;
- Panel_PCA_FST con 76.1%, 91.8% e 92.2% quando si selezionano rispettivamente 48, 96 e 131 SNPs;
- Panel_RF con 73.3%, 88.2% e 96.3% per 48, 96 e 158 SNPs per pannello.

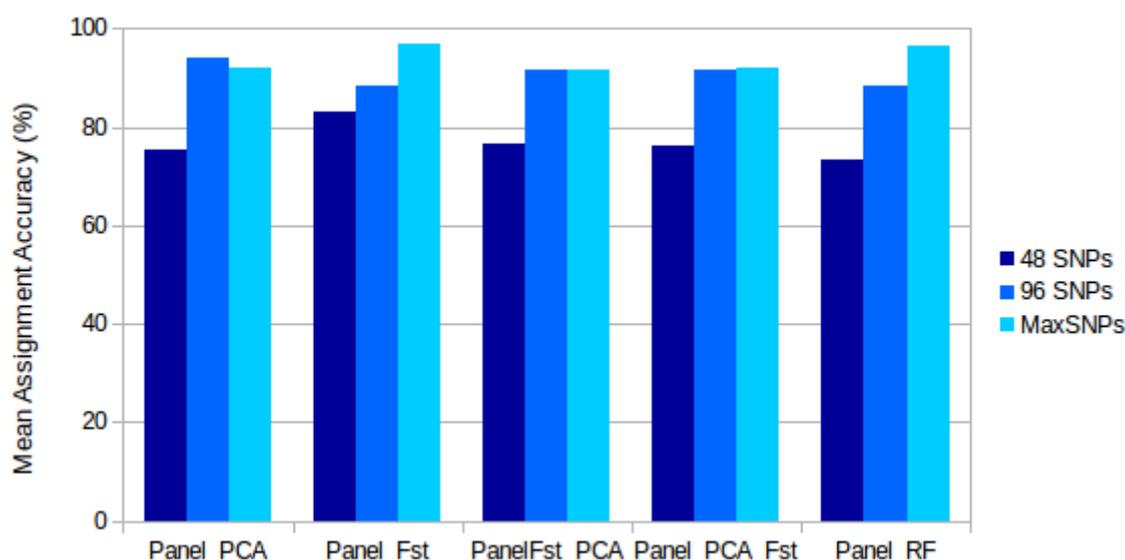


Figura 14. Media della precisione di assegnazione (in %) per tutte le classi e le dimensioni dei pannelli. Le medie sono state stimate con 500 repliche del metodo Monte-Carlo.

Tabella 5. Media delle assegnazioni (e deviazione standard) per classe e dimensione dei pannelli. Medie e deviazione standard sono state stimate attraverso 500 repliche di Monte-Carlo.

Pannello	48 SNPs	96 SNPs	MaxSNPs
Panel_PCA	75.5 (7.11)	94.0 (4.63)	92.1 (4.79)
Panel_Fst	83.1 (7.95)	88.5 (6.75)	96.9 (4.17)
Panel_Fst_PCA	76.6 (9.85)	91.5 (4.92)	91.4 (4.47)
Panel_PCA_Fst	76.1 (6.74)	91.8 (4.97)	92.2 (4.91)
Panel_RF	73.3 (6.55)	88.2 (6.24)	96.3 (4.28)

Il test ANOVA a due vie ha mostrato differenze significative tra le tre dimensioni crescenti del pannello ($p\text{-value} = 7.168\text{E-}05$), ma nessuna differenza è stata evidenziata in modo significativo dal confronto dei metodi di selezione degli SNPs considerando le tre dimensioni tutte insieme ($p\text{-value} = 0.6998$). Il test HSD di Tukey è stato quindi applicato solo al fattore dimensione e ha mostrato differenze significative tra il pannello più piccolo (48 SNP) e i rimanenti due ($p\text{-value} \leq 0.0001$ per i due confronti), ma non c'era sostanzialmente alcuna differenza tra il pannello intermedio (96 SNPs) e il più grande (MaxSNPs) ($p\text{-value} = 0.2858$).

3.4 Discussione

Negli ultimi anni si sono moltiplicati i lavori che utilizzano marcatori SNPs in studi genetici di popolazione in diversi organismi non modello (Garvin et al. 2010; Seeb et al. 2011; Helyar et al. 2011; Jeffries et al. 2016; Krohn et al. 2018). In tutti questi studi gli SNP hanno dimostrato di dare dei risultati migliori e più dettagliati rispetto ai microsatelliti. Il nostro lavoro si posiziona in questo contesto, dando un'ulteriore prova di come spesso anche avendo meno campioni ma migliaia di marcatori si possano incrementare le potenzialità sia negli studi di genetica di popolazione che in quelli di assegnazione geografica di individui di origine sconosciuta. Qui mostriamo come gli SNP provenienti da un sequenziamento ddRAD siano sostanzialmente più potenti di un numero relativamente piccolo, anche se altamente variabile, di loci microsatellite sia nelle analisi di struttura genetica che in quelle di assegnazione geografica. Anche nel caso di assegnazioni fatte con un numero ridotto di SNPs diagnostici.

Gli obiettivi principali di questo progetto erano quelli di:

- indagare la struttura genetica di un campione di *T. hermanni* provenienti da popolazioni naturali, lungo tutto il suo areale, utilizzando migliaia di marcatori genetici (SNP) ottenuti con un sequenziamento ddRAD;
- selezionare, tra i migliaia di SNP disponibili, una piccola quantità di SNP diagnostici che consenta di ridurre i costi e velocizzare la genotipizzazione di campioni di origine sconosciuta potenzialmente utilizzabili per progetti di reintroduzione;
- confrontare i risultati delle analisi di struttura e di diversità genetica condotte su marcatori molecolari diversi (STR e ddRADseq).

3.4.1 Struttura genetica STR vs. ddRADseq

I risultati provenienti dalle analisi sulla struttura genetica, sul nostro dataset completo di SNPs, ci hanno permesso di individuare un differenziamento a livello geografico più dettagliato rispetto a lavori precedenti basati su marcatori microsatelliti (Perez et al. 2014) e quelli ottenuti qui. I dati provenienti dal ddRADseq evidenziano la presenza di 8 clusters genetici tra i nostri 70 campioni (a differenza dei 5 trovati con i loci microsatelliti se consideriamo le stesse popolazioni campionate).

I dettagli più interessanti sulla sottostruttura delle nostre popolazioni sono stati ottenuti attraverso l'analisi con fineRADstructure, che sembra essere maggiormente performante almeno nel nostro caso, con marcatori SNPs provenienti da sequenziamento di tipo

(dd)RAD. FineRADstructure non solo ci ha permesso di individuare un differenziamento genetico tra le due sottospecie e tra gruppi precedentemente riconosciuti con marcatori STR, ma ha rivelato ulteriori approfondimenti sulla sottostruttura di questi cluster. Questo specialmente in Calabria dove siamo ora in grado di riconoscere ben 3 gruppi genetici distinti e nelle maggiori isole mediterranee, Sicilia e Sardegna, dove troviamo due cluster distinti. Nel primo caso non è un risultato del tutto inaspettato, dal momento che questa area del sud Italia è un ben noto rifugio glaciale e area di hotspot di diversità genetica per molte specie di clima temperato (Canestrelli et al. 2008; 2006; 2010; 2012; Chiochio et al. 2017). Nel secondo caso, anche se il differenziamento tra Sicilia e Sardegna non è così notevole ($F_{ST} = 0,06$), è invece un risultato che nei precedenti lavori non era stato riscontrato (vedere capitolo 1; Perez et al. 2014; Zenboudji et al. 2016).

Abbiamo escluso la possibilità che le differenze dei risultati tra i due marcatori potessero essere causate da un differente numero di popolazioni campionate utilizzate creando un dataset STR parziale (STR2), utilizzando solamente campioni provenienti dalle stesse località, e lo abbiamo confrontato con i risultati ottenuti con gli SNP derivanti dal ddRADseq. Una importante differenza tra i risultati ddRADseq e STR era che i cluster identificati con la PCA erano considerevolmente più distinti rispetto al dataset STR, a sottolineare che il potere statistico risultava maggiore nell'identificare le differenze quando si usavano marcatori SNP. Con il dataset STR2 era possibile distinguere le due sottospecie mentre i sottogruppi erano quasi completamente sovrapposti e difficilmente distinguibili, segno che questi marcatori non hanno un potere statistico così forte per rilevare una struttura geografica così fine. A differenza del dataset ddRADseq dove anche ai livelli inferiori era possibile riconoscere bene gli 8 gruppi, con una leggera sovrapposizione soltanto tra SIC and SAR, dato confermato anche dal basso livello di F_{ST} tra questi due cluster.

Per quanto riguarda invece i confronti tra STR2 e ddRADseq per alcune misure di base della variabilità, abbiamo usato come prior lo stesso numero di cluster per entrambi i dataset (8 gruppi rilevati sul dataset ddRADseq) e abbiamo trovato in linea generale una correlazione positiva e significativa tra i due dataset. Molto più forte nel caso degli F_{ST} , più debole nell'eterozigosità. In linea generale anche se correlati, i due tipi di marcatori hanno mostrato livelli medi di eterozigosità e degli F_{ST} diversi. Per quanto riguarda l'eterozigosità i valori più bassi ottenuti con gli SNP dipendono probabilmente da tassi di mutazione molto più bassi rispetto ai loci STR. Per gli F_{ST} , invece, valori più alti nel dataset ddRADseq dipendono verosimilmente dal fatto che per alti livelli di eterozigosità e possibili omoplasie con i marcatori STR si possono avere sottostime della divergenza.

Sebbene i campioni presenti nel dataset ddRADseq includevano soltanto il 23% dei campioni compresi nel dataset STR2, questi erano sufficienti ad ottenere una migliore comprensione della struttura genetica in questa specie, soprattutto nell'enfatizzare una struttura più fine tra le popolazioni naturali.

3.4.2 Assegnazioni geografiche STR vs. ddRADseq

I risultati ottenuti sui pannelli di SNP e sul pannello STR, hanno mostrato una notevole differenza di accuratezza. Anche considerando il pannello SNPs con la percentuale di assegnazione corretta minore (Panel_RF con 48 SNPs → 73.3%), il pannello STR mostrava una percentuale di accuratezza molto inferiore (Pannello STR → 46.8%). Questo ci indica che andrebbero riconsiderate le assegnazioni effettuate sul pannello STR dei lavori precedenti (vedere capitolo 1) ma che andrebbero anche indagate nel dettaglio le differenze tra i due metodi utilizzati, GENECLASS2 e AssignPOP.

Dai risultati dei test, sui pannelli di SNPs, non abbiamo notato una differenza importante nelle capacità di assegnazioni tra i pannelli con 96 SNPs e quelli con il massimo di SNPs possibili (MaxSNP), per tutti i metodi di selezioni considerati, come evidenziato dalla differenza non significativa tra i due pannelli nel test HSD Tukey. Cioè aggiungendo SNPs, da una certa soglia in poi, non sembra possibile ottenere più informazioni. Questo è vero soprattutto per Panel_PCA, Panel_FST_PCA e Panel_PCA_FST.

È importante segnalare come già con un pannello di soli 48 SNPs, basato sui valori FST più alti per ogni nodo, riusciamo ad ottenere una percentuale di assegnazione superiore all'80%. Vista l'accuratezza e i costi di genotyping questo pannello potrebbe essere la scelta ideale.

Interessante anche notare i risultati del pannello basato su Random Forest comparati con quello basato su FST. Il Panel_RF ha fornito l'accuratezza di assegnazione più bassa tra tutti i pannelli più piccoli (73,3%) mentre il Panel_FST è risultato il migliore in quel caso; è poi notevolmente migliorato con 96 SNPs ma ancora ottenendo la percentuale più bassa (88,2%), stavolta insieme al Panel_FST (88,5%); infine, tra i pannelli con le dimensioni maggiori, è risultato quello con la percentuale più alta (96,3%), di nuovo insieme al pannello FST (96,9%). I test di assegnazione eseguiti con GENECLASS2 hanno evidenziato che entrambi i pannelli con le dimensioni maggiori di Panel_FST e Panel_RF erano gli unici due a raggiungere il 100% di accuratezza di assegnazione. Questa tendenza è invertita rispetto a ciò che è stato notato in Sylvester et al. (2018), dove i pannelli basati su RF quasi sempre performavano meglio i pannelli basati su FST. Tuttavia, il potere di assegnazione maggiore

del Panel_FST rispetto al Panel_RF, già con pochissimi SNPs, che abbiamo riscontrato, potrebbe essere dovuto al fatto che la struttura genetica è molto più forte nel nostro dataset rispetto a quello analizzato da Sylvester et al. (2018). È anche interessante notare che nessun SNP era condiviso tra i due tipi di pannelli a 48 SNP, mentre, all'aumentare delle dimensioni del pannello, questa coppia ha condiviso la maggior quantità di SNPs tra tutti i confronti a coppie all'interno delle stesse dimensioni del pannello (6 e 25 per pannelli di dimensioni 96 SNP e MaxSNP rispettivamente). Si deve anche considerare che questi SNPs potrebbero essere sufficienti per distinguere i cluster genetici precedentemente identificati, ma dato che la selezione degli SNPs è stata fatta per massimizzare il potere di discriminazione ad ogni nodo con contributi uguali, potrebbero quindi non sempre essere adeguati. Pertanto, sarà necessario verificare l'identità di tutti quegli SNPs comuni (se ogni nodo è ancora ugualmente rappresentato). D'altra parte, un'altra caratteristica peculiare è che sia il Panel_FST che il Panel_RF hanno sempre mostrato il maggior numero di SNP “privati” (24 e 15, 27 e 23, 48 e 63; per ogni dimensione del pannello rispettivamente). Si potrà quindi verificare se, combinando gli SNP di questi due metodi, il potere di assegnazione del nuovo pannello possa essere maggiore rispetto ai singoli pannelli dei due metodi.

Apparentemente, l'unione delle informazioni provenienti dai metodi di selezione PCA ed FST non è stata efficace per raggiungere un'elevata potenza di discriminazione. Le tre classi di pannelli, Panel_PCA, Panel_FST_PCA e Panel_PCA_FST hanno condiviso quasi in toto gli SNPs per tutte le dimensioni del pannello, risultando però significativamente le migliori opzioni a 96 SNPs.

3.4.3 Considerazioni finali

I loci SNP offrono numerosi vantaggi aggiuntivi rispetto ai microsatelliti oltre a quelli evidenziati in questo lavoro. Gli SNP sono distribuiti in modo più denso e uniforme in tutto il genoma (Xing et al. 2005) e hanno mostrato dei tassi di errore più bassi durante la genotipizzazione (Montgomery et al. 2005; Morin et al. 2009). Gli SNP si prestano anche a un numero maggiore di analisi, compresa l'identificazione di loci anomali (Hohenlohe et al. 2012) o di piccole regioni di introgressione nel genoma (Hohenlohe et al. 2013). Infine, gli SNP sono anche molto meno suscettibili all'omoplasia rispetto ai microsatelliti (Morin et al. 2004). Oppen et al. (2000) hanno trovato evidenza di omoplasia in 10 dei 13 loci microsatelliti, e Cornuet et al. (2010) dimostrano che tale omoplasia rende i microsatelliti inaffidabili e soggetti a errori quando utilizzati per inferenze su lunghe scale temporali. Per

questi motivi, gli SNPs hanno un chiaro vantaggio rispetto ai microsatelliti per caratterizzare la divergenza della popolazione su tempi lunghi.

Possiamo quindi concludere che se si deve scegliere tra un approccio “microsatelliti”, con molti campioni ma pochi loci, e un approccio con “(dd)RADseq”, con meno campioni ma molti più loci, il secondo rappresenta decisamente l’opzione migliore sia per indagare processi evolutivi e la genetica di popolazione di una specie, sia per ottenere un pannello di loci altamente informativi per uso in genetica forense o per assegnazioni geografiche di individui destinati a progetti di reintroduzione.

Per quanto riguarda gli aspetti pratici e di biologia della conservazione, in questo lavoro abbiamo generato un pannello di SNP (48 SNPs con il metodo FST) per la testuggine di Hermann che sarà disponibile per ulteriori studi. Questi 48 SNPs sono stati già inviati alla LGC Genomics (KASP) per una test in silico per un futuro sequenziamento, con risultato positivo.

L'uso di questo nuovo pannello di SNP potrà essere utilizzato su un numero elevato di campioni, a costi contenuti, e fornirà le basi per nuovi strumenti pratici e per ottenere informazioni approfondite per la conservazione e la gestione della testuggine di Hermann. Data l'urgenza degli interventi di conservazione e gestione per questa specie (centinaia di individui che si trovano oggi in cattività potrebbero essere utilizzati per progetti di reintroduzione), riteniamo che la ricerca sullo stato delle popolazioni naturali e in cattività, sulla struttura genetica e sul commercio illegale trarrebbero grande beneficio dallo spostamento verso l'utilizzo di dati genetici provenienti da marcatori SNPs. Questo aumenterebbe il potenziale di condivisione dei dati tra ricercatori e consentirebbe la rapida espansione dei database, nel tempo e nello spazio, necessari per una risposta tempestiva all'attuale crisi nelle prospettive di sopravvivenza in natura di questa specie in molte aree geografiche.

Capitolo 4: Le traslocazioni come strumento di conservazione

4.1 Introduzione

Le traslocazioni a scopo conservazionistico sono il trasferimento deliberato di organismi, da popolazioni in cattività o selvatiche, da un sito ad un altro (Ewen 2012; IUCN 2013). Devono avere come obiettivo quello di portare un beneficio conservazionistico al livello di popolazione, specie o ecosistema, e non solo fornire un aiuto agli individui traslocati.

Le traslocazioni consistono in diversi tipi di azioni (IUCN 2013) (Fig. 1):

- i rinforzi e le reintroduzioni, che avvengono all'interno del range storico di una specie;
- le introduzioni, che comprendono la colonizzazione assistita e la sostituzione ecologica, al di fuori dell'areale storico della specie.

Le traslocazioni possono essere uno strumento molto efficace per la conservazione, soprattutto se utilizzate in unione con altri tipi di soluzioni (es. ricostituzioni di habitat), ma richiedono una giustificazione rigorosa. La valutazione di fattibilità dovrebbe includere e determinare i benefici della conservazione rispetto ai costi e ai rischi che una traslocazione potrebbe comportare e analizzare inoltre eventuali azioni di conservazione alternative (Armstrong et al. 2007; Converse et al. 2013; IUCN 2013). I rischi insiti in una traslocazione sono molteplici e possono interessare sotto diversi aspetti le specie ombrello, le loro comunità associate e le funzioni dell'ecosistema sia nella popolazione d'origine che in quella di destinazione. Questi rischi possono anche essere collegati alle preoccupazioni delle comunità locali, soprattutto se si tratta di specie che possono avere un impatto sulle attività umane (Ewen et al. 2012).

Qualunque progetto di traslocazione proposto dovrebbe comprendere una valutazione completa del rischio considerando anche gli sforzi necessari ed appropriati alla situazione (es. tipo di azione e/o tipo di organismo). Nei casi in cui il rischio è alto e/o c'è incertezza sul loro impatto, una traslocazione non dovrebbe proseguire (Ewen et al. 2012; IUCN 2013). Specialmente le traslocazioni di organismi al di fuori del loro range di origine sono considerate essere particolarmente a rischio dati i numerosi esempi di specie rilasciate che sono successivamente diventate invasive, spesso con impatti estremamente negativi. Ne è

un esempio il rospo delle canne introdotto nel nord est dell'Australia, dalle Hawaii (anche qui introdotto qualche anno prima), nel 1935 per il controllo di parassiti (coleotteri) della canna da zucchero. Da una popolazione introdotta che contava 102 giovani rospi, si è arrivati a circa 200 milioni di individui, creando enormi problemi alla biodiversità locale (Phillips et al. 2006).

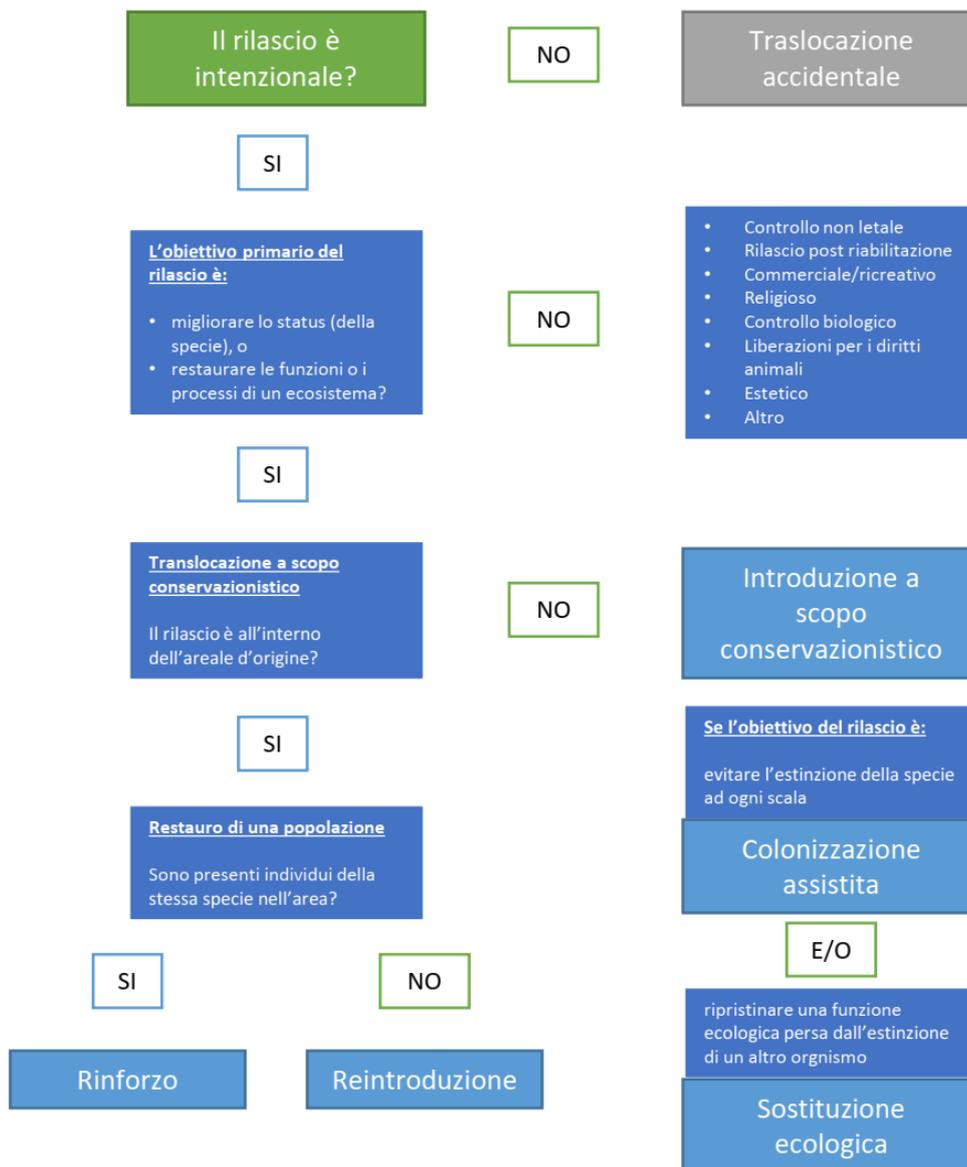


Figura 1. Spectrum delle traslocazioni estratte dalle linee guida per le reintroduzioni e altri tipi di traslocazioni della IUCN (2013). Sono mostrate tutte le tipologie di traslocazione.

Qualsiasi traslocazione avrà un impatto e sarà influenzata dalle attività umane. Gli aspetti sociali, i fattori economici e quelli politici devono essere parte integrante della fattibilità e della progettazione di una traslocazione (Converse et al. 2013; IUCN 2013). Questi fattori

influenzeranno la realizzazione del progetto e spesso quindi sarà importante un approccio efficace e multi-disciplinare, con l'utilizzo di competenze tecniche e sociali che siano in grado di rappresentare tutti gli interessi in gioco. L'organizzazione di una traslocazione a scopo conservazionistico dovrebbe includere le fasi della progettazione e della gestione. Andrebbero inoltre raccolte le informazioni di base e analizzate le minacce, e programmati cicli di monitoraggio e valutati gli interventi potenziali una volta che la traslocazione è in corso. Questo garantisce che il processo e i progressi siano registrati in modo che eventuali cambiamenti negli obiettivi o nel management della traslocazione possano essere giustificati e i risultati determinati obiettivamente.

Infine, le traslocazioni dovrebbero essere completamente documentate, e i loro risultati resi pubblici e disponibili per informare future pianificazioni di altri interventi di conservazione.

4.2 Pianificare una traslocazione

Ogni traslocazione a scopo conservazionistico dovrebbe avere degli obiettivi definiti chiaramente. Qualsiasi tipo di traslocazione dovrebbe seguire un processo logico che comprenda i seguenti step (IUCN 2013) (Fig. 2):

- idea iniziale
- progettazione
- fattibilità
- valutazione del rischio
- processo decisionale
- attuazione
- monitoraggio
- regolazione
- valutazione

Le linee guida per le reintroduzioni e altri tipi di traslocazioni della IUCN (2013) suggeriscono inoltre di pianificare una traslocazione seguendo l'approccio per la pianificazione della conservazione di specie dello *Species Survival Commission* (SSC) (IUCN 2008), che richiede specifiche su obiettivi, strategie e azioni.

Prima di iniziare la preparazione di un progetto di traslocazione è importante essere consapevoli del fatto che il processo richiede uno sforzo notevole in termini di tempo, di fondi e di personale. Di conseguenza, uno dei primi passi necessari sarà raccogliere fondi per sostenere tutto il processo. La raccolta fondi può, tuttavia, coincidere con il passo altrettanto necessario di identificare e ottenere il sostegno dei principali soggetti interessati, ad esempio i governi, le ONG, i parchi e gli zoo. Questi soggetti sono sicuramente più propensi a sostenere un processo, sia finanziariamente che con la loro partecipazione, se sono coinvolti e si aspettano che vengano soddisfatte le loro necessità.

Per garantire che queste azioni abbiano le migliori possibilità di andare a buon fine, lo IUCN incoraggia che vengano coinvolte tutte le parti interessate. Le istituzioni pubbliche, le ONG che si occupano di conservazione, altri specialisti della conservazione (es. guardiaparco e forze dell'ordine), specialisti di specie (alcuni dei quali possono naturalmente lavorare per agenzie governative e ONG), rappresentanti delle comunità locali o autorità locali, il settore privato (ad esempio, gli operatori turistici) e altre parti interessate importanti dovrebbero essere esplicitamente inclusi in tutte le fasi.

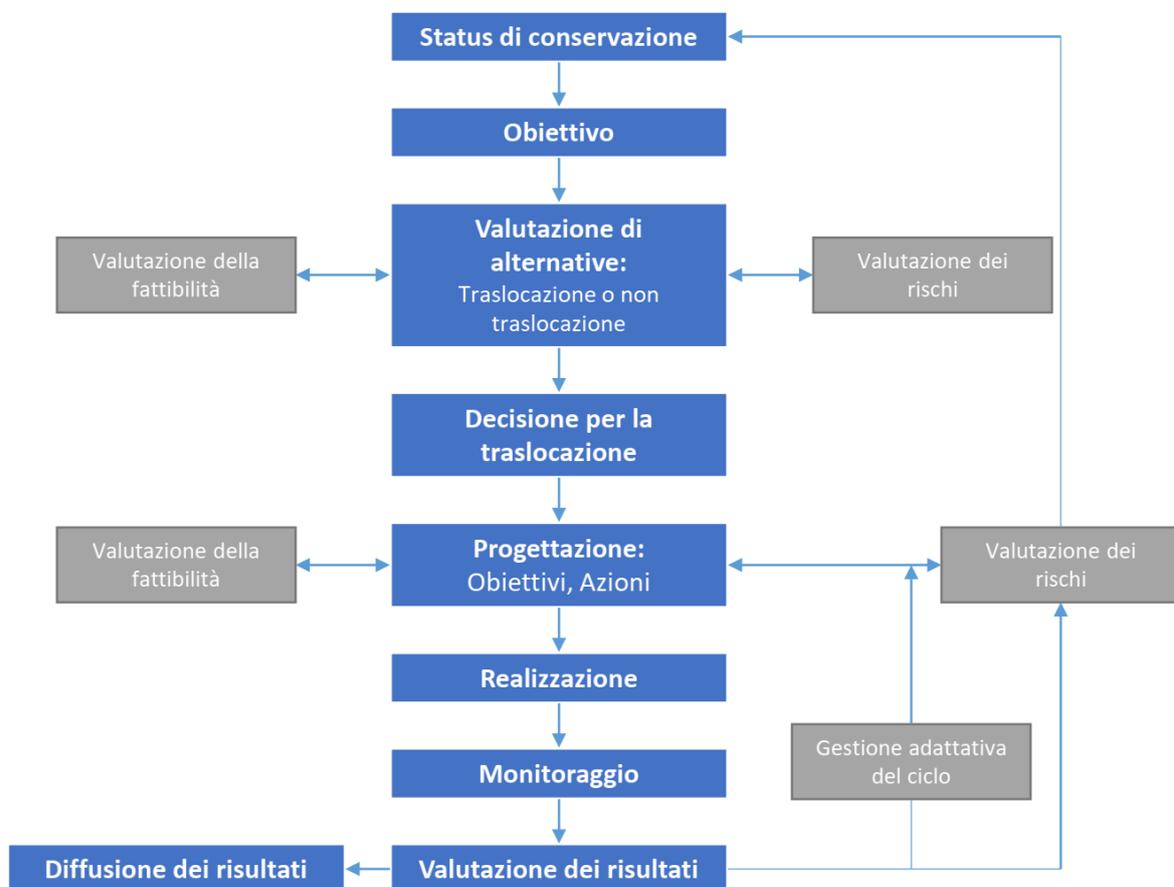


Figura 2. Step consigliati dalle linee guida per le reintroduzioni e altri tipi di traslocazioni della IUCN (2013) per un programma di traslocazione a scopo conservazionistico.

4.3 Status delle reintroduzioni

I programmi di reintroduzione della fauna selvatica cercano di ristabilire popolazioni vitali di una specie in aree in cui sono oggi estinte.

Negli anni passati, gli sforzi per migliorare i risultati delle reintroduzioni si sono concentrati più sul superamento delle problematiche ecologiche ma con scarsa attenzione agli aspetti riguardanti la leadership e la gestione dei progetti (Sutton and Lopez 2014).

Nei progetti che includono le reintroduzioni tipicamente mancano i controlli, le repliche, il monitoraggio adeguato, o anche la dichiarazione di obiettivi espliciti (Seddon et al. 2007). In tali casi, non viene appreso nulla su quali variabili sono davvero importanti in una reintroduzione di successo, e perfino meno informazioni si ricavano dai fallimenti, che tendono ad non essere documentati.

Negli anni passati molti progetti di reintroduzione erano traslocazioni puramente gestionali, spesso condotte all'insuccesso a causa di una mancanza di pianificazione adeguata, di animali rilasciati inappropriati, di campioni di dimensioni ridotte e di mancanza di risorse. L'atteggiamento per lo più seguiva il motto "mettiamo alcuni animali là fuori e vediamo se sopravvivono" (Seddon et al. 2007).

Il monitoraggio post-rilascio era trascurabile o assente, così che le cause o le tempistiche degli insuccessi erano sconosciute, così come i processi con cui le popolazioni reintrodotte si stabilivano nel nuovo ambiente (Scott and Carpenter 1987; Dodd Jr and Seigel 1991; Seddon 1999; Fischer and Lindenmayer 2000; Seigel and Dodd Jr 2000; Ewen and Armstrong 2007; Armstrong and Seddon 2008; Scott et al. 2010; Sutherland et al. 2010).

Attraverso gli sforzi del *Reintroduction Specialist Group* e dei biologi che iniziavano a collaborare a progetti di reintroduzione, il monitoraggio post-rilascio ha cominciato ad essere adeguato e i fallimenti, così come i successi, ad essere documentati e resi disponibili in letteratura scientifica.

Seddon et al. (2007) hanno esaminato i progressi nelle reintroduzioni compilando un elenco di 515 progetti pubblicati dal 1935 su riviste peer-reviewed. La compilazione risultante non è quindi un riassunto esaustivo delle pubblicazioni di progetti di reintroduzione, ma è comunque indicativa delle tendenze a lungo termine.

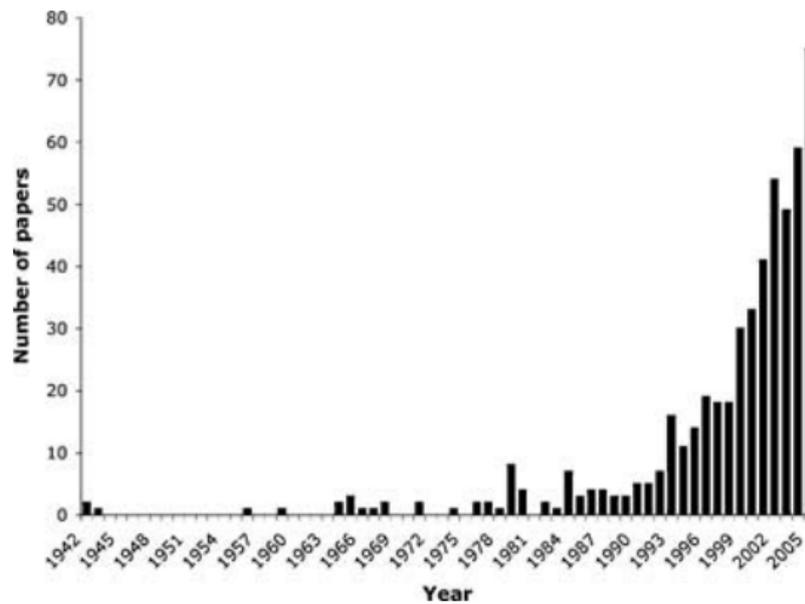


Figura 3. Numero di lavori pubblicati su riviste peer-reviewed per anno (dal 1942 al 2005) relativi a progetti di reintroduzione (Seddon et al. 2007).

Il trend in generale mostra come ci siano state poche pubblicazioni tra il 1942 e la fine degli anni '70, seguito poi da un numero modesto ma crescente di lavori fino alla fine degli anni '90, e un aumento marcato dal 2000 (Fig. 3).

Un altro studio più recente (Ewen et al. 2014) ha esplorato le attitudini degli operatori alle reintroduzioni rispetto agli obiettivi prefissati, e verificato se i problemi riscontrati impattassero sugli obiettivi dichiarati e sul successo finale della traslocazione. Lo studio è stato focalizzato sui progetti di reintroduzione erpetologica raccolti in sei volumi della serie *Global Perspectives in Reintroduction Biology* dello IUCN e dell'RSG (Soorae 2008, 2010, 2011, 2013, 2016, 2018). Nel complesso i professionisti hanno dichiarato che erano in gran parte riusciti a raggiungere i loro obiettivi sulla base delle categorie di successo proposte (Fig. 4). Il 60% e il 43 % dei progetti riguardanti i rettili e gli anfibi, rispettivamente, sono stati classificati come di grande successo o di successo. Nessun progetto con i rettili è stato considerato fallimentare, mentre sono state rilevate 4 reintroduzioni fallite con gli anfibi. C'è da dire però che molti degli studi analizzati specificavano obiettivi di conservazione e non solo, ma non includevano poi indicatori utili a valutare l'effettivo successo nel conseguire tali obiettivi

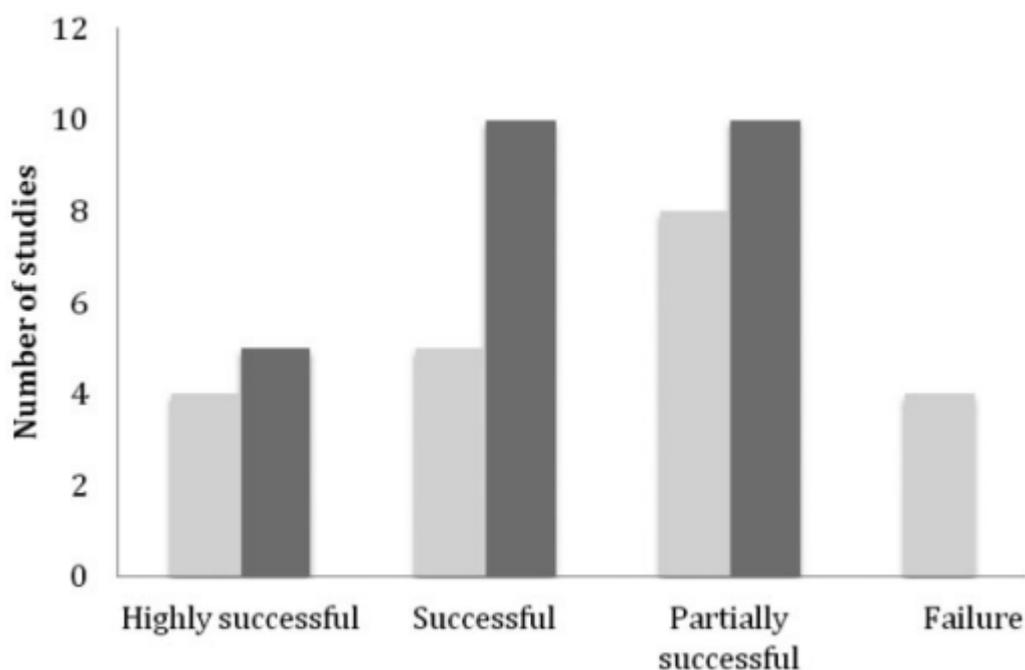


Figura 4. Esito di 40 studi erpetologici, relativi a reintroduzioni, pubblicati nei sei volumi della serie *Global Perspectives in Reintroduction Biology* dello IUCN e dell’RSG (Soorae, 2008, 2010, 2011, 2013, 2016, 2018). Le barre in grigio chiaro sono i casi di studio riguardanti gli anfibi e le barre in grigio scuro i rettili. Ai responsabili dei progetti, presi in esame, è stato chiesto di definire il risultato dei loro lavori entro quattro categorie, “highly successful”, “Successful”, “Partially successful” e “Failure” (Ewen et al. 2014).

4.4 Reintroduzioni: aspetti genetici

Se una specie si è estinta da un sito in cui esisteva in precedenza, gli individui che formeranno la popolazione reintrodotta devono provenire da popolazioni selvatiche o in cattività. Nel reperimento di individui per la reintroduzione, è importante considerare l’adattamento locale, l’adattamento alle condizioni di cattività (per la conservazione *ex situ*), la possibilità di depressione da inbreeding e depressione da outbreeding, la tassonomia, l’ecologia e la diversità genetica della popolazione di origine (Frankham 2010). Le popolazioni reintrodotte vanno incontro a una maggiore vulnerabilità dovuta alle influenze dei processi evolutivi di deriva, selezione e flusso genico. Questo può essere dovuto alle piccole dimensioni delle popolazioni, alle differenze climatiche ed ecologiche tra habitat originari e di reintroduzione e alla presenza di altre popolazioni che potrebbero ibridarsi (Latch and Rhodes 2006; Frankham 2008; Sork 2015).

Se la specie da reintrodurre è rara in natura, è probabile che si abbia un numero di popolazioni basso e quindi si dovrebbe prestare attenzione in modo da evitare l’inbreeding e la depressione da inbreeding (Earnhardt 199; Frankham et al. 2012). L’inbreeding può cambiare la frequenza della distribuzione allelica in una popolazione e potenzialmente

portare a una variazione cruciale della diversità genetica (Frankham et al 2012). Questi eventi porteranno a livelli sempre più bassi la variazione genetica e ad una accumulazione e fissazione dei geni deleteri, diminuendo la fitness degli individui ibridati. Inoltre, può verificarsi una depressione da outbreeding se la popolazione reintrodotta ha la possibilità di ibridarsi con le popolazioni esistenti allo stato selvatico, il che può risultare in una prole con fitness ridotta e con un minore adattamento alle condizioni locali. Per ridurre al minimo questi effetti, si dovrebbe selezionare gli individui in modo da catturare la maggior variabilità genetica possibile e tentare di abbinare le condizioni del sito di origine a quelle locali di reintroduzione (Robert 2009; Frankham et al 2012). Alcuni programmi di reintroduzione utilizzano piante o animali da popolazioni in cattività per formare una popolazione reintrodotta (Robert 2009; Frankham et al 2012). Quando si reintroducono individui in cattività, c'è il rischio che si siano adattati a delle condizioni non più naturali, a causa della selezione differenziale dei genotipi in cattività rispetto allo stato selvatico (Eldridge and Sunnucks 2011). La base genetica di questo adattamento è la selezione di alleli rari e recessivi che sono deleteri in natura ma vantaggiosi in cattività (Frankham 2008). Di conseguenza, gli animali adattati alla cattività mostrano una ridotta tolleranza allo stress, una maggiore docilità e una perdita di adattamenti locali (McPhee 2003; Frankham 2008). L'entità dell'adattamento è direttamente correlata all'intensità della selezione, alla diversità genetica, alle dimensioni effettive della popolazione e al numero di generazioni in cattività. Le caratteristiche selezionate in cattività sono in larghissima parte svantaggiate in natura, quindi tali adattamenti possono portare a una riduzione della fitness dopo la reintroduzione. I progetti di reintroduzione che introducono animali selvatici generalmente registrano tassi di successo più elevati rispetto a quelli che utilizzano animali allevati in cattività (Frankham 2008). L'adattamento genetico alla cattività può essere minimizzato attraverso alcuni metodi di gestione (Frankham 2008, 2010):

- introducendo nuovi individui in cattività;
- minimizzando le dimensioni effettive della popolazione, il numero di generazioni trascorse in cattività e la pressione selettiva;
- ristabilendo la diversità genetica dovuta alla frammentazione delle popolazioni.

Nelle reintroduzioni da cattività, la traslocazione degli animali allo stato naturale ha implicazioni sia per le popolazioni in cattività che in quelle selvatiche. La reintroduzione di animali geneticamente idonei migliora la diversità genetica delle popolazioni reintrodotte mentre riduce quella delle popolazioni in cattività; al contrario, gli animali allevati in

cattività geneticamente idonei possono anche essere simili agli individui in natura e quindi aumentare il rischio di depressione da inbreeding se reintrodotti. L'aumento della diversità genetica è favorito dalla rimozione di individui geneticamente sovra-rappresentati dalle popolazioni in cattività e dall'aggiunta di animali con scarsa parentela genetica (Earnhardt 1999; Frankham 2010).

Affinché le popolazioni reintrodotte si stabiliscano con successo e massimizzino la fitness riproduttiva, si dovrebbero eseguire dei test genetici per selezionare quali individui saranno i fondatori delle popolazioni reintrodotte e continuare a monitorare le popolazioni dopo la reintroduzione (IUCN 2013; Canessa et al. 2016). Le linee guida per le reintroduzioni e le altre traslocazioni a scopo conservazionistico della IUCN (2013) nel dettaglio indicano come i fondatori dovrebbero mostrare caratteristiche, basate sulla provenienza genetica, appropriate e comparabili con le popolazioni originali o rimanenti in natura e non essere frutto di riproduzioni tra parenti. Sono disponibili numerosi metodi per misurare la parentela genetica e la variazione tra gli individui all'interno delle popolazioni. I comuni strumenti di valutazione della diversità genetica includono marcatori microsatellitari, analisi del DNA mitocondriale e marcatori a singolo polimorfismo (SNP) (vedi Introduzione). Dopo la reintroduzione, gli strumenti di monitoraggio genetico possono essere utilizzati per ottenere dati quali l'abbondanza della popolazione, la dimensione effettiva della popolazione e la struttura della popolazione e possono anche essere usati per identificare casi di inbreeding all'interno di popolazioni reintrodotte o ibridazione con popolazioni esistenti geneticamente compatibili. Il monitoraggio genetico a lungo termine è raccomandato per tenere traccia dei cambiamenti nella diversità genetica della popolazione reintrodotta e determinare il successo di un programma di reintroduzione. Cambiamenti genetici negativi, come ad esempio la perdita di eterozigosi, possono indicare che ci sia bisogno di un intervento gestionale, come l'integrazione di nuovi individui, necessario per la sopravvivenza della popolazione reintrodotta (Mowry et al. 2015; La Haye et al. 2017; Roques et al. 2018).

4.5 Legislazione in Italia

Fino agli anni '90 non erano presenti norme che trattavano specificatamente le immissioni faunistiche in Italia e quelle contenute nella legge 11 febbraio 1992, n. 157, "Norme per la protezione della fauna selvatica omeoterma e per il prelievo venatorio" riguardanti solo mammiferi e uccelli, sembravano pensate più per regolarizzare l'esercizio dell'attività venatoria. Nella suddetta legge inoltre, il termine reintroduzione non veniva mai preso in considerazione e non venivano definiti i principi cui questo tipo di intervento faunistico

doveva adeguarsi (Spagnesi and Toso 1997). Nel 1997, il decreto del Presidente della Repubblica dell'8 settembre (DPR 357/97) ha regolato le procedure per l'adozione delle misure previste dalla direttiva "Habitat", ai fini della salvaguardia della biodiversità. Le procedure disciplinate dal regolamento sono intese ad assicurare il mantenimento o il ripristino, in uno stato di conservazione soddisfacente, degli habitat naturali e delle specie di fauna e flora selvatiche di interesse comunitario. L'articolo 5 impone ai proponenti di piani territoriali, urbanistici e di settore, ivi compresi i piani agricoli e faunistico-venatori e le loro varianti, di predisporre studi per individuare gli effetti che tali piani possono avere sui siti di importanza comunitari o sulle zone speciali di conservazione. Tale norma richiede quindi, per ogni intervento che prevede rischi di introduzione in natura di specie alloctone (allevamenti ittici, impianti di acquacoltura, interventi di controllo biologico a fini di protezione delle produzioni agricole, ecc), una specifica autorizzazione da parte degli enti di gestione dei siti di importanza comunitaria basata su una valutazione di incidenza. Il decreto del Presidente della Repubblica del 12 marzo 2003, n. 120 (DPR 120/2003) ha modificato e integrato il Decreto dell'8 settembre 1997, n. 357 (DPR 357/97) disciplinando le immissioni in Italia di specie animali e vegetali. Nel dettaglio:

- prevede il divieto di reintroduzione, introduzione e ripopolamento in natura di specie e popolazione non autoctone;
- affida al Ministero dell'ambiente, sentito il Ministero delle politiche agricole alimentari forestali e del turismo e l'Istituto superiore per la protezione e ricerca ambientale, per quanto di competenza, la redazione delle linee guida per la reintroduzione e il ripopolamento delle specie autoctone dell'allegato D del DPR 357/97 (specie animali e vegetali di interesse comunitario che richiedono una protezione rigorosa);
- prescrive che ogni intervento di reintroduzione e ripopolamento delle specie in allegato D del DPR 357/97 debba essere autorizzato dagli organismi competenti (Regioni, Province ed Enti di gestione delle aree protette nazionali) e tale autorizzazione sarà espressa sulla base delle linee guida di cui al punto 2.

Infine, nel 2007, sono state redatte e pubblicate le linee guida per l'immissione di specie faunistiche a cura dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA; ex Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica). L'ISPRA è un ente pubblico, sottoposto alla vigilanza del Ministro dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare, che si occupa di

protezione ambientale, delle emergenze ambientali e di ricerca. Tali linee guida si prefiggono di:

- contribuire alla definizione dei principi generali per la reintroduzione e i ripopolamenti delle specie faunistiche elencate nell'allegato D del DPR 357/97;
- individuare i contenuti dello studio di fattibilità relativo alla reintroduzione e ai ripopolamenti delle suddette specie faunistiche; cioè analizzare tutti gli aspetti di un progetto di reintroduzione valutando inoltre la struttura genetica di popolazione della specie oggetto di recupero;
- definire i principi applicativi del divieto di reintroduzione di specie e popolazioni di fauna alloctona sancito dal DPR 357/97, come modificato dal DPR 120/03.

Per quanto riguarda nello specifico le reintroduzioni dei rettili e anfibi in Italia, le linee guide per l'immissione di specie faunistiche rimandano a una sezione (box 10, redatta dal Dott. Marco Zuffi) dove ne vengono valutati gli aspetti ed eventuali provvedimenti. Si suggerisce che interventi di questo genere possono essere presi in considerazione solo nel caso di specie per le quali siano disponibili dati distributivi attendibili (di scala almeno regionale), la cui tassonomia sia definita e, aspetto molto importante e spesso non considerato, la cui struttura genetica delle popolazioni sia conosciuta. Inoltre andrebbero evitati interventi di immissione (reintroduzione o ripopolamento) nel caso di specie acclimatate in un dato territorio, ma di origine alloctona.

4.6 Traslocazioni di testuggini di Hermann: esempi

Similmente ad altre testuggini minacciate e carismatiche, come la testuggine Gopher (*Gopherus polyphemus*) e la testuggine del deserto di Agassiz degli Stati Uniti (*Gopherus agassizii*) (Tuberville et al. 2008; Nussear et al. 2012; Germano et al. 2015), traslocazioni di migliaia di testuggini di Hermann per scopi di conservazione o mitigazione sono state condotte in Spagna, Francia, Italia e Romania (revisioni in: Vetter 2006; Bertolero et al. 2011). Mentre per quanto riguarda i progetti di traslocazione avvenuti in Italia (es. Lo Valvo et al. 2012) la letteratura è carente e non se ne conoscono i risultati a medio e lungo termine, in Spagna si è portato avanti un progetto lungimirante che può essere preso ad esempio almeno per la parte di management (Bertolero et al. 2018). In Spagna sono stati effettuati due progetti di traslocazione (una reintroduzione e un rinforzo) della *Testudo hermanni*. Il primo ebbe inizio nel 1987 nel Parco Naturale del Delta dell'Ebro, dove furono liberate in

totale 66 testuggini, in due differenti periodi distanti 10 anni. Tutti gli individui provenivano da cattività, e per la maggior parte degli individui il tempo esatto in cattività era sconosciuto. Il sito mancava di una popolazione consolidata della testuggine di Hermann al momento del primo rilascio, anche se il sito si trovava all'interno del range storico della specie (Bertolero and Martínez Vilalta 1994). La riserva è un'area legalmente ed efficacemente protetta (accesso limitato). Gli individui rilasciati e i loro discendenti si riproducono regolarmente (Bertolero et al. 2007). Questo progetto di reintroduzione è stato monitorato annualmente dal 1988 al 2015 e dal 2011 con l'aiuto di un cane addestrato. Il secondo progetto di traslocazione è stato invece un rinforzo eseguito da una ONG ad Alfurí nell'isola di Minorca (Isole Baleari), dove 48 adulti sono stati rilasciati nella primavera del 2003 (tra marzo e aprile). Questa azione mirava a rilasciare testuggini che erano state consegnate da persone a un centro di recupero per animali selvatici e non a recuperare la popolazione locale (la densità delle tartarughe residenti era sconosciuta al momento del rilascio). La maggior parte delle tartarughe rilasciate proveniva probabilmente da cattività (Mateo 2011). Il sito di rilascio era proprietà pubblica inclusa nella rete Natura 2000, in cui sono consentiti l'accesso ed alcune attività antropiche. Anche in questo caso le testuggini sono state monitorate annualmente fino al 2016 (tutte gli individui sono state rilasciati precedentemente all'interno del sito di studio).

Questi due progetti di traslocazione, monitorati per 14 e 29 anni, hanno portato a diversi risultati che possiamo qui riassumere e che dovrebbero essere presi come modello per futuri progetti di traslocazione di testuggini (Bertolero et al. 2018):

- è stata evidenziata una minore sopravvivenza degli esemplari rilasciati durante la fase di stabilizzazione (da 1 a 3 anni dal rilascio) quando già era presente una popolazione locale nel sito;
- dopo la stabilizzazione, il tasso di sopravvivenza delle testuggini era molto elevato e non era influenzato dalla densità di popolazione;
- le condizioni fisiche prima della liberazione erano simili tra le testuggini ricampionate e quelle morte o mancanti, quindi non sembrerebbe esserci un'evidenza del collegamento tra i due fattori;
- il successo nel rilasciare un piccolo numero di individui dipende fortemente dalla sopravvivenza a lungo termine dell'adulto;
- la sopravvivenza a lungo termine è cruciale nei progetti di traslocazione di specie longeve, dando meno importanza quindi alla sopravvivenza a breve termine (primo anno);

- liberare le testuggini (per il benessere degli individui in cattività o per mitigare gli impatti negativi dell'uomo), in una popolazione già presente nell'area, non è raccomandato nella maggior parte delle circostanze, soprattutto se non si hanno conoscenze genetiche e quindi sulla provenienza di questi individui.

Infine, i progetti di traslocazione con animali longevi, come le testuggini terrestri, devono implementare programmi di monitoraggio a lungo termine per più di 2-3 anni dopo il rilascio, per valutarne il tasso di sopravvivenza (idealmente per almeno 10 anni). Nell'analisi della sopravvivenza degli individui è importante includere un possibile effetto “costo di rilascio” (cioè una mortalità aggiuntiva durante un certo periodo post-rilascio rispetto a quella attesa naturale nello stesso intervallo) e, se presente, determinare quanto tempo è lungo e se interessa tutti i gruppi rilasciati. Tecnicamente, non è necessario che i tassi di sopravvivenza siano simili a quelli di animali selvatici. La sopravvivenza minima dipende dall'obiettivo e dalle dinamiche di popolazione: se l'obiettivo è una popolazione stabile o in crescita, è sufficiente un tasso di sopravvivenza che permetta di mantenere un tasso di crescita positivo della popolazione (anche se questo è inferiore a situazioni ideali di animali selvatici). Questa distinzione è importante perché una sopravvivenza più bassa può a volte essere compensata da un maggior reclutamento (*compensatory recruitment*). Per questo è importante non perdere di vista l'obiettivo ultimo della gestione (*population growth*) di cui i singoli *vital rates* (*survival* e *recruitment*) sono componenti intermedi. Questa frase si potrebbe semplificare in “dovrebbero mostrare tassi di sopravvivenza simili agli esemplari selvatici o comunque sufficienti a garantire la persistenza della popolazione”. Inoltre, i primi anni appena dopo il rilascio sono un periodo critico e potrebbero rappresentare un'opportunità per migliorare le possibilità di successo, dal momento che i nuovi rilasci effettuati durante questo periodo possono essere più efficienti per ridurre la probabilità di estinzione. Dopo il periodo di acclimatazione, le testuggini rilasciate dovrebbero mostrare tassi di sopravvivenza simili agli esemplari selvatici (se sono disponibili informazioni per le popolazioni non minacciate o per le specie correlate). Se questo traguardo non viene raggiunto, il successo della reintroduzione diventa compromesso e il progetto deve essere attentamente valutato per opzioni di gestione alternative o dovrebbe essere fermato del tutto.

4.7 Animali confiscati: possibili soluzioni

Quando gli animali sono confiscati dalle autorità governative, queste hanno la responsabilità di collocarli in modo appropriato. Entro i limiti della legge, la decisione finale sulla collocazione degli animali confiscati deve puntare a tre obiettivi (IUCN 2013; CITES 2016):

- massimizzare il valore di conservazione degli esemplari senza compromettere in alcun modo la salute, il comportamento o lo stato di conservazione delle popolazioni selvatiche o in cattività della specie;
- scoraggiare ulteriori commerci illegali o irregolari della specie;
- fornire una soluzione “umana”, sia che si tratti di mantenere gli animali in cattività, di rimetterli in libertà, oppure nel caso non ci siano alternative di procedere con l'eutanasia.

L'aumento della regolamentazione sul commercio di piante e animali selvatici, e l'applicazione di tali regolamenti, ha comportato un aumento del numero di traffici intercettati dalle autorità governative a seguito del mancato rispetto delle leggi. In alcuni casi, l'intercettazione è il risultato di un commercio palesemente illegale; in altri, è dovuta ad altri tipi di irregolarità, come ad esempio pratiche burocratiche insufficienti o incomplete provenienti dal paese esportatore o imballaggi scadenti che hanno compromesso il benessere degli animali durante la spedizione. Mentre in alcune circostanze il numero di animali confiscati è piccolo, in molti altri il numero è nelle centinaia (es. il caso della *Testudo hermanni* in Italia). Sebbene, in molti paesi, gli animali confiscati sono di solito donati a zoo o acquari, questa opzione si dimostra meno praticabile quando si hanno un gran numero di animali, soprattutto per le specie più soggette al commercio illegale. La comunità internazionale degli zoo ha riconosciuto che il collocamento di animali, a bassa priorità di conservazione, in cattività, può essere un beneficio per questi individui, ma potrebbe anche portare ad un dispendio degli sforzi di conservazione nel loro complesso, che potrebbero invece essere dirottati su specie a rischio (CITES 2016). La mancanza di linee guida specifiche ha portato alla collocazione degli animali confiscati in modi diversi, molti dei quali non coerenti con gli obiettivi di conservazione. Come nel caso più generale di animali detenuti in cattività, scelte sbagliate potrebbero anche avere forte impatto negativo sulla conservazione minacciando le popolazioni selvatiche esistenti. Le minacce alle popolazioni esistenti possono assumere diverse forme (IUCN 2013, CITES 2016):

- malattie e parassiti acquisiti dagli animali rilasciati mentre erano in cattività possono diffondersi in popolazioni selvatiche esistenti;
- individui rilasciati in popolazioni esistenti o in aree vicine a popolazioni esistenti, potrebbero non essere geneticamente simili a quelli selvatici, con conseguente ibridazione;
- animali tenuti in cattività, in particolare gli individui più giovani, possono acquisire, da individui di altre specie affini, dei comportamenti inappropriati; il rilascio di questi animali potrebbe provocare un'ibridazione interspecifica.

Per gli animali confiscati, appartenenti a specie in via di estinzione o minacciate, è necessario uno sforzo particolare per valutare se e come questi animali potrebbero contribuire a un programma di conservazione. La decisione su quale opzione scegliere, riguardo la collocazione degli animali confiscati, dipenderà da vari fattori legali, sociali, economici e biologici. Nel caso si decida di reintrodurre gli animali in natura le linee guida della CITES propongono di seguire un albero decisionale che permetta di fare la scelta migliore a seconda del caso (Fig. 5). Spesso gli animali confiscati hanno origine ignota, con la genetica quindi si potrebbe risolvere uno dei passaggi cruciali dell'albero decisionale (Fig. 5; Q3).

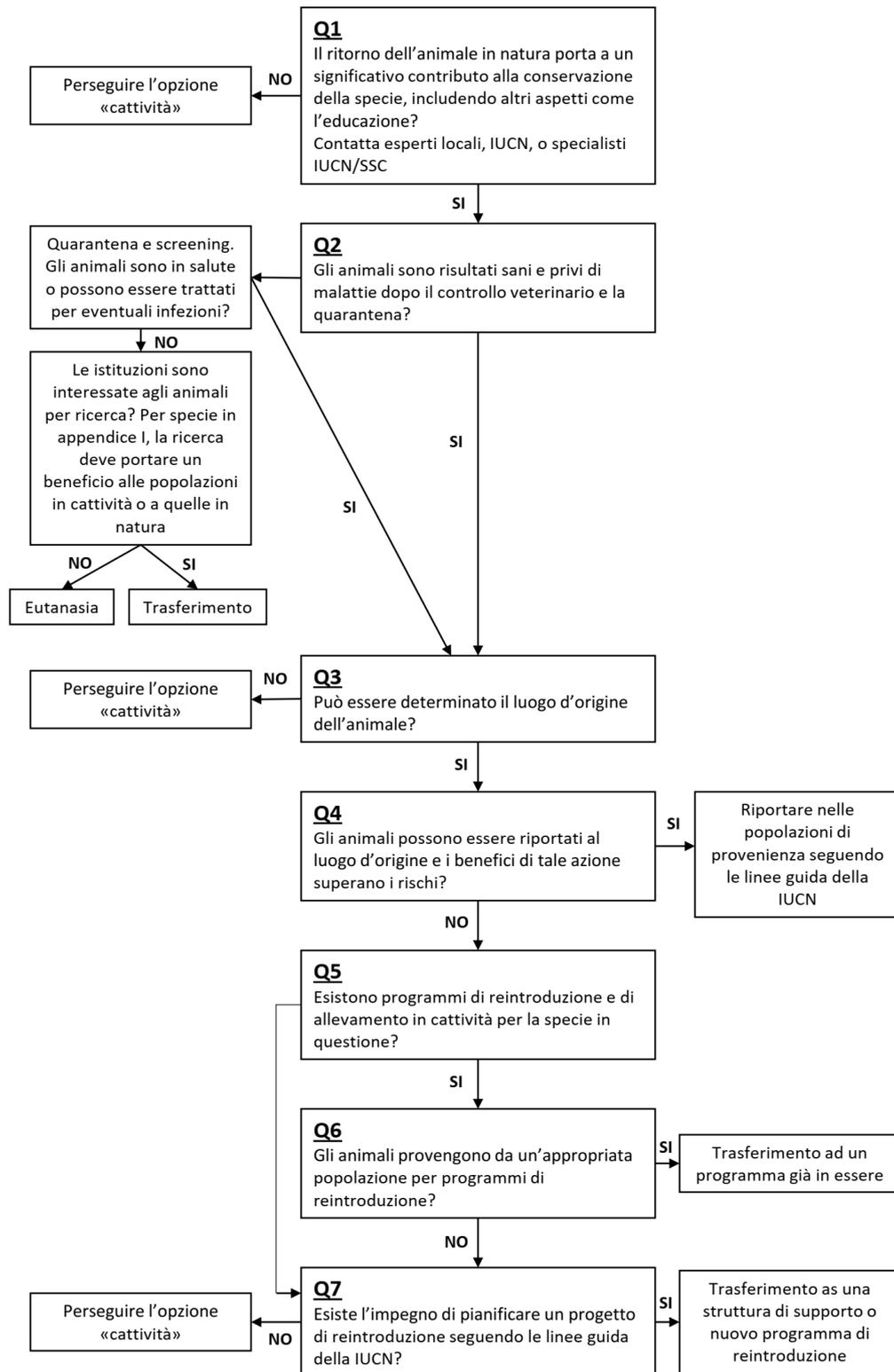


Figura 5. Albero decisionale in caso di scelta di liberare in natura animali provenienti da cattività (CITES 2016).

Sebbene la CITES suggerisca che il rimpatrio di animali confiscati nel paese di esportazione debba essere considerata come una opzione, il trattato non impone in alcun modo che gli animali siano rimessi in libertà in quel paese. Quando viene considerato il rimpatrio,

l'autorità artefice della confisca deve garantire che i destinatari degli animali siano pienamente consapevoli di ciò e delle opzioni per la loro collocazione (CITES 2016).

Esempi celebri di traslocazioni in natura di animali detenuti in cattività sono il cervo di Padre David (*Elaphurus davidianus*) in Cina (Hu and Jiang 2002), l'orice arabo (*Oryx leucoryx*) in Chad (Spalton et al. 1999), la volpe veloce (*Vulpes velox*) in Canada (Moehrenschlager and Macdonald 2003) e la grande scimmia leonina (*Leontopithecus rosalia*) in Brasile (Kleiman and Rylands 2002). In quest'ultimo caso, la perdita dell'habitat, unita alla cattura di animali vivi a scopo commerciale, ha provocato un rapido declino delle popolazioni naturali. Quando le riserve protette furono ampliate e il commercio limitato, individui in cattività, provenienti da sequestri, furono usati per integrare le popolazioni naturali depauperate (Kleiman and Rylands 2002).

Soprattutto il rinforzo è stata una delle azioni maggiormente adottate quando singoli animali feriti da attività umana hanno ricevuto cure veterinarie e poi sono stati rilasciati (CITES 2016). Tali attività sono comuni in molti paesi occidentali e esistono programmi specifici per specie come ricci e rapaci. Per quanto sia un'attività comune, il rinforzo porta con sé il gravissimo rischio che gli individui detenuti in cattività, anche temporaneamente, siano potenziali vettori di malattie. A causa dei rischi inerenti alle malattie, il rinforzo dovrebbe essere impiegato solo nei casi in cui vi è un beneficio di conservazione diretto e misurabile (demografico o genetico), come per esempio quando questa azione può essere fondamentale per la vitalità della popolazione naturale in cui questo viene rilasciato.

Come abbiamo visto, ci sono sicuramente diversi vantaggi di tipo biologico e conservazionistico nel riportare gli animali allo stato selvatico, sia attraverso la reintroduzione che il rinforzo di una popolazione esistente. È importante anche sottolineare che restituire gli animali allo stato selvatico può lanciare un forte messaggio politico/educativo sul destino degli animali (ad esempio i casi degli oranghi e degli scimpanzé) e può servire a promuovere i valori di conservazione locali. Tuttavia, come parte di qualsiasi programma educativo o di sensibilizzazione pubblica, è necessario sottolineare i costi e le difficoltà associate a un rilascio in natura.

4.8 Progetto di reintroduzione della testuggine di Hermann (*Testudo hermanni*) nel Parco Regionale del Conero (Marche, Italia): motivazioni dell'intervento

La *T. hermanni* è considerata una specie importante e chiave degli ambienti di tipo mediterraneo e degli ambienti forestali costieri termofili come foreste xerofile di *Quercus ilex* e *Q. suber*, *Pinus pinea* e *P. pinaster* (Corti et al. 2011). Zone queste che specialmente in Italia sono oggi notevolmente ridotte a causa delle attività antropiche. L'area del Conero rappresenta una delle poche aree con questo tipo di caratteristiche nella zona adriatica (Fig. 6-7). L'ipotesi di una reintroduzione della *T. hermanni* nel Parco Regionale del Conero, si basa innanzitutto sulla idoneità del suo territorio che presenta ancora vaste estensioni di macchia mediterranea e la presenza di specie vegetali di cui si nutre abitualmente questa specie. Inoltre è già in essere un accordo e una collaborazione tra il Parco del Conero, e il suo Direttore Dr. Marco Zannini, con l'Università di Ferrara per procedere con una reintroduzione pilota.



Figura 6. Localizzazione del Parco Regionale del Conero (Ancona, Marche, Italia). (Google Maps)

Premesso ciò, le motivazioni della reintroduzione derivano dalla constatazione che si potrebbero avere notevoli ripercussioni sia in ambito conservazionistico che in ambito socio-economico, culturale e turistico.



Figura 7. Foto della vegetazione di alcuni ambienti tipici mediterranei del Parco Regionale del Conero. (Roberto Biello)

Implicazioni per la conservazione

In Italia, la testuggine di Hermann è a rischio di estinzione in natura. Un progetto di reintroduzione in aree idonee dove la specie era presente può rappresentare un significativo contributo alla conservazione della specie. Il fatto che centinaia di individui sono mantenuti in cattività nei centri di recupero o di sequestro, e che tra questi animali sia possibile selezionare quelli più idonei sulla base delle condizioni di salute e del profilo genetico, rendono questo progetto ad alta fattibilità. Uno studio pilota di questo genere potrebbe spingere altri Parchi e aree protette a intraprendere un percorso simile, con grande giovamento per la conservazione della specie e la sua distribuzione sul territorio italiano.

Implicazioni socio-economiche, culturali e turistiche

La testuggine di Hermann è una specie di grande interesse per il grande pubblico. Ne sono testimonianza il diffuso utilizzo come animale da compagnia, le diverse associazioni nate a scopo conservazionistico o in generale di appassionati (per esempio, Green Teen Team, Tartaclub) e i numerosi allevamenti presenti per la vendita ai privati. E' quindi presumibile che un progetto di reintroduzione nelle aree del Parco verrebbe accolto con grande favore dalla popolazione locale, e potrebbe favorire l'interesse dei turisti a visitare le aree del Parco dove poter incontrare testuggini libere. Se corredato da pannelli e altro materiale informativo

sulla specie, sul declino in natura e sulle reintroduzioni, e sulle metodologie genetiche impiegate, e anche sui singoli individui che il visitatore potrebbe incontrare, il progetto si presterebbe molto bene ad attività didattiche per le scuole, e in generale di formazione ambientale per tutti. Infine, l'utilizzo per le reintroduzioni di animali provenienti da cattività permetterebbe di alleggerire il lavoro e i costi dei centri di recupero.

Non essendo ancora state diramate delle linee guide specifiche per le traslocazioni di questa specie in Italia, questo progetto rappresenterebbe uno studio pilota (quindi con l'utilizzo di pochi individui per non rischiare in caso di un fallimento delle perdite notevoli) per future reintroduzioni all'interno del territorio italiano.

Recenti studi condotti su diversi taxa indicano come il numero totale di individui rilasciati non è predittivo del successo di una reintroduzione (White et al. 2012; Cochram-Bierdeman et al. 2015; Rummel et al. 2016). Diversi fattori e circostanze potrebbero influire sulla sopravvivenza, soprattutto nel breve termine, degli individui rilasciati: l'età degli individui, il sesso, il metodo di rilascio, le condizioni di allevamento e i fattori climatici. Progetti riguardanti il rilascio in natura di individui di *T. hermanni* mostrano come il numero di soggetti da immettere possa variare da caso a caso (Bertolero et al. 2007, 2018; Drechsler et al. 2016) e che si possono ottenere popolazioni vitali a lungo termine quando viene rilasciato un numero relativamente piccolo di femmine, e solamente quando queste mostrano un alto livello di sopravvivenza nel lungo periodo (Bertolero et al. 2018). Inoltre è importante stimare, nei primi mesi/anni dopo la reintroduzione, il tasso di sopravvivenza degli individui attraverso il monitoraggio costante e considerare questo periodo come un'opportunità per migliorare le possibilità di successo, dal momento che eventuali nuovi rilasci effettuati possono essere più efficienti per ridurre la probabilità di estinzione (Bertolero et al. 2018). Sulla base degli animali che saranno disponibili per la reintroduzione, selezionati sulla base delle caratteristiche genetiche e di salute, verranno introdotti per questo studio pilota tra 6 e 10 maschi e tra 10 e 14 femmine. Gli individui utilizzati per l'immissione in natura saranno scelti previa mappatura genetica e controllo dello stato di salute di ogni individuo. Tutti i soggetti dovranno essere in un buono stato di salute e non dovranno mostrare ferite e assenza di fattori in grado di limitare il loro naturale comportamento compresi fattori di stress cronici (per esempio, deformazioni del carapace). Gli individui idonei saranno scelti dai recinti dei vari nostri collaboratori che li detengono al momento, i Carabinieri Forestali di Punta Marina (RA) e il Parco Natura Viva di Bussolengo (VR). Per tutta la parte di monitoraggio post-rilascio ci siamo avvalsi della collaborazione di un esperto in traslocazioni e biologia delle

reintroduzioni, il Dr. Stefano Canessa (University of Ghent), che collaborerà con noi su questa parte del progetto.

Vista e considerata la biologia della specie, dal punto di vista ecologico l'immissione di individui di *Testudo hermanni hermanni* non avrà effetti negativi su fauna e flora del Conero. In linea generale si escludono problemi inerenti meccanismi di competizione per le aree trofiche, di rifugio, le aree riproduttive con altre specie animali. Possibili interazioni o ibridazioni con popolazioni autoctone di *T. hermanni* sono da escludere vista la scarsità/assenza di tali popolazioni. Nell'altamente improbabile caso in cui esistessero delle popolazioni native, di cui oggi se ne esclude la presenza, esse verserebbero in condizioni estremamente critiche e pertanto la loro possibile coesistenza o ibridazione con individui reintrodotti, accuratamente selezionati per rappresentare meglio possibile gli animali un tempo presenti, non può non essere valutata positivamente. Ulteriori attività che, nell'ambito del monitoraggio post-rilascio, saranno svolte riguarderanno:

- la verifica della compatibilità con altri progetti di conservazione che interessino l'area di intervento o aree limitrofe;
- la valutazione dei potenziali effetti della reintroduzione sulle popolazioni umane locali e sulle attività antropiche di interesse economico (analisi dei possibili conflitti e dei costi economici derivanti dalla reintroduzione).

Tutte le testuggini rilasciate saranno dotate di un dispositivo di tipo VHF. Questi dispositivi consentiranno di ricattare gli animali e monitorarne gli spostamenti per il periodo successivo al rilascio, per verificare lo stato di adattamento degli individui reintrodotti al nuovo territorio. Qui sono riportati gli apparecchi della Biotrack che verranno utilizzati e che sono già stati testati in altri progetti su tartarughe (Hammer 2015; Drechsler et al. 2016, 2018):

- Transmitter (TW3, Biotrack) (Fig. 8);
- Ricevitore (8MHz SIKA, Biotrack);
- Antenna (Yagi, Biotrack).

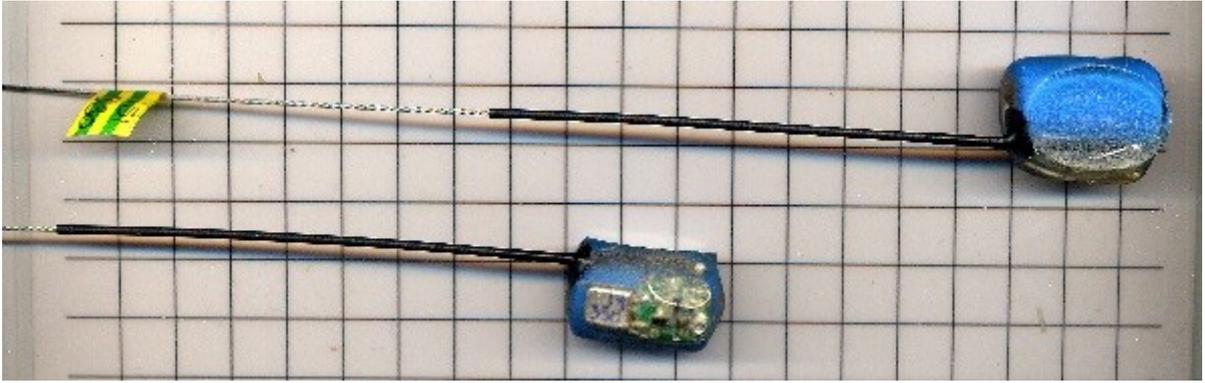


Figura 8. Transmitter VHF, modello TW3 (Biotrack). (www.biotrack.com)

Verranno installati, inoltre, su alcuni degli individui, piccole emittenti satellitari che forniscono un quadro molto dettagliato degli spostamenti e del loro comportamento spaziale. Solitamente vengono impiegati apparecchi che raccolgono delle localizzazioni GPS e le trasmettono ad intervalli regolari tramite la rete di telefonia mobile. Esiste un modello in commercio della Biotrack che è in grado di coprire le due funzioni (GPS/VHF):

- Transmitter GPS/VHF (PinPoint Beacon, Biotrack) (Fig. 9).

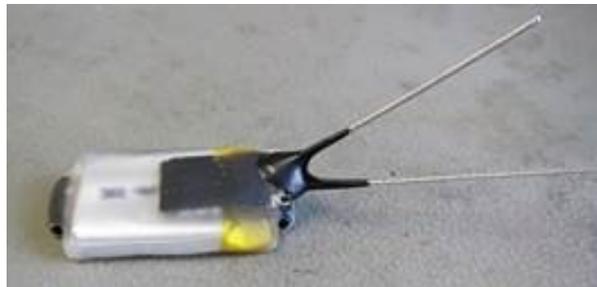


Figura 9. Transmitter GPS/VHF, PinPoint Beacon (Biotrack). (www.biotrack.com)

Infine abbiamo in atto una collaborazione anche con un associazione con scopi conservazionistici ed educativi, il Green Teen Team, che ci aiuterà nella parte riguardante gli aspetti di divulgazione ed educazione legati al progetto.

Considerazioni finali

T. hermanni è una specie di notevole interesse conservazionistico. Gran parte delle popolazioni dell'Italia e dell'Europa occidentale mediterranea si sono estinte o si sono ridotte durante il secolo scorso. Negli ultimi anni anche nell'areale orientale della specie si sta verificando un trend negativo dello stato delle popolazioni. La specie è inclusa nella CITES, che ne regola il commercio, è protetta dalla Direttiva Habitat, e dalla Convenzione di Berna, è inclusa nella Red List dell'IUCN e catalogata come prossima alla minaccia (NT = *Near Threatened*) (IUCN 2017). La sottospecie occidentale è classificata come *Endangered* (IUCN 1996).

Questo lavoro fornisce un contributo alle conoscenze di base sulla distribuzione geografica della diversità genetica all'interno e soprattutto analizza molti aspetti da considerare per la futura pianificazione di interventi gestionali e di reintroduzione. In particolare, i risultati ottenuti che:

- con un piccolo pannello di loci STR, siamo in grado di assegnare alle loro potenziali aree di origine il 70% di testuggini (su un totale di 458 individui) mantenute in cattività e di cui non si avevano informazioni sulla provenienza; tra gli animali non assegnati abbiamo riscontrato anche individui probabilmente discendenti da eventi di ibridazione, tra le due sottospecie, avvenuti in cattività;
- la presenza di individui, della sottospecie orientale, nelle popolazioni naturali della penisola italiana e della Sicilia potrebbero essere una conseguenza dell'ampio commercio di animali domestici che ha colpito questa specie, con centinaia di migliaia di tartarughe raccolte per lo più nell'Europa sud-orientale tra gli anni '60 e '80 ed esportate nell'Europa occidentale; questa evidenza indica chiaramente che la fuga o il rilascio di individui non endemici tra le popolazioni autoctone selvatiche non è così raro, con potenziali implicazioni genetiche ed epidemiologiche;
- individui considerati morfologicamente *T. hercegovinensis* (o *T. h. hercegovinesis*), provenienti dalla costa adriatica della penisola balcanica, dovrebbero essere classificati come *T. h. boettgeri* poiché non è stata riscontrata una divergenza genetica che possa giustificare l'appartenenza di questi esemplari ad una sottospecie o specie distinta;
- l'utilizzo di migliaia di nuovi marcatori provenienti da un sequenziamento ddRAD ha rivelato ulteriori approfondimenti sulla sottostruttura nelle popolazioni occidentali, specialmente in Calabria dove siamo ora in grado di riconoscere 3 gruppi

genetici distinti e nelle maggiori isole mediterranee, Sicilia e Sardegna, dove troviamo due cluster distinti;

- tra un approccio con molti campioni ma pochi loci (es. microsatelliti), e un approccio con meno campioni ma molti più loci (es. SNPs provenienti da ddRADseq), il secondo rappresenta decisamente l'opzione migliore in *T. hermanni* sia per la struttura genetica di popolazione, sia per ottenere un pannello di loci altamente informativi per uso in genetica forense o per assegnazioni geografiche di individui destinati a progetti di reintroduzione; quindi un alto numero di loci SNP è sufficiente per compensare le limitazioni dovute a un ridotto numero di campioni.
- il piccolo pannello di SNP diagnostici da noi sviluppato, visto il suo costo ridotto per individuo (stimato in circa 10-12 euro) potrà essere utilizzato in molti campioni in futuro e fornirà le basi per nuovi strumenti pratici e per ottenere informazioni approfondite per la conservazione e la gestione della *T. hermanni*.

Data la necessità di interventi di conservazione e management, di cui questa specie ha bisogno, riteniamo che questo lavoro, congiuntamente con quelli passati, debbano essere tradotti rapidamente in azioni pratiche e soluzioni che possano restaurare popolazioni ormai scomparse e ridare la libertà agli individui potenzialmente idonei che oggi si trovano in cattività.

Ringraziamenti

Un grazie speciale va prima di tutto al mio relatore, Giorgio Bertorelle, che ha avuto la pazienza di seguirmi in questi 3 anni di dottorato. Grazie per la disponibilità, per i consigli, per gli insegnamenti e per esserci stato sempre, ad ogni mio dubbio e ad ogni mia domanda. Mi ha dato l'opportunità di poter lavorare a tutto ciò e mi ha permesso di poter vivere due esperienze all'estero che mi hanno dato tanto e che non dimenticherò mai.

Un grazie a tutte le persone del gruppo di Genetica di Ferrara, che mi hanno aiutato a crescere in questi tre anni, e da cui ho avuto la possibilità di imparare da ognuno qualcosa. In particolare al mio compagno di stanza, Emiliano Trucchi, non solo un compagno ma un amico e a Silvia Fuselli per avermi sopportato e per le chiacchierate.

Un grazie particolare va inoltre a Giuseppe Di Mauro e Marco Zarattini, due compagni di dottorato con cui ho condiviso i momenti belli e anche quelli più difficili in questi anni a Ferrara.

Ringrazio le tesiste, Giulia Fabbri, Camilla Brogginì e Maria Luisa Boglino, a cui spero di aver dato almeno quanto loro hanno dato a me.

Grazie anche a Konrad Lohse e a Jane Hughes che mi hanno ospitato nei loro gruppi all'University of Edinburgh e alla Griffith University.

Inoltre ringrazio tutte le persone che hanno collaborato a questo progetto e che mi hanno permesso di portare a termine il mio percorso di dottorato, da Stefano Mazzotti a Mauro Zampiglia, grazie per tutte le lunghe discussioni sulle testuggini.

In ultimo la mia famiglia, che mi ha permesso di fare tutto ciò e che non mi ha mai fatto mancare niente, anche quando non sono stato presente quanto avrebbero voluto...

Bibliografia

- Allendorf FW, Hohenlohe PA, Luikart G (2010) Genomics and the future of conservation genetics. *Nat Rev Genet* 11:697
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol Evol* 16:613–622
- Allendorf FW, Luikart G, Aitken S (2013) Conservation and the Genetics of Populations, 2nd Edition. John Wiley & Sons
- André C, Svedäng H, Knutsen H, et al (2016) Population structure in Atlantic cod in the eastern North Sea-Skagerrak-Kattegat: early life stage dispersal and adult migration. *BMC Res Notes* 9:63
- Andrinos G (1987) L'aigle royal en Grèce. In Premier Colloque International sur l'Aigle Royal en Europe. L'Aigle Royal en Europe. Briançon, France: Maison de la Nature, pp 18–22
- Ariano-Sánchez D, Torres-Almazán M (2010) Rediscovery of *Abronia campbelli* (Sauria: Anguinae) from a pine-oak forest in southeastern Guatemala: habitat characterization, natural history, and conservation status. *Herpetol Rev* 41:290
- Armstrong DP, Seddon PJ (2008) Directions in reintroduction biology. *Trends Ecol Evol* 23:20–25
- Auliya M (2003) Hot trade in cool creatures: a review of the live reptile trade in the European Union in the 1990s with a focus on Germany. *TRAFFIC Eur Bruss Belg*
- Auliya M, Altherr S, Ariano-Sanchez D, et al (2016) Trade in live reptiles, its impact on wild populations, and the role of the European market. *Biol Conserv* 204:103–119
- Beck B (2001) A vision for reintroduction. *AZA Commun* 20–21
- Belkhir K (2004) GENETIX 4.05, Windows TM software for population genetics. Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR, 5000
- Benazzo A, Trucchi E, Cahill JA, et al (2017) Survival and divergence in a small group: The extraordinary genomic history of the endangered Apennine brown bear stragglers. *Proc Natl Acad Sci* 114:9589–9597
- Bernini F, Doria G, Razzetti E, Sindaco R (2006) Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia. *Soc Herpetol Ital*
- Bertolero A, Cheylan M, Hailey A, et al (2011) *Testudo hermanni* (Gmelin 1789)–Hermann's tortoise. Conservation biology of freshwater turtles and tortoises: a compilation project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group. *Chelonian Research Monographs*, 5, 059-1
- Bertolero A, Martínez Vilalta A (1994) Presencia histórica de *Testudo hermanni* en las comarcas del Baix Ebre y Montsia (sur de Catalunya). *Boletín Asoc Herpetológica Española* 5:2–3
- Bertolero A, Pretus JL, Oro D (2018) The importance of including survival release costs when assessing viability in reptile translocations. *Biol Conserv* 217:311–320
- Böhm M, Collen B, Baillie JEM, et al (2013) The conservation status of the world's reptiles. *Biol Conserv* 157:372–385

- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120
- Bour R (2004a) *Testudo boettgeri* Mojsisovics, 1889. *Manouria* 7:9–10
- Bour R (2004b) A new character for the identification of populations of the Hermann's tortoise, *Testudo hermanni* Gmelin, 1789. *Salamandra* 40:59–66
- Bour R (1995) Une nouvelle espèce de tortue terrestre dans le Péloponnèse (Grèce). *Dumerilia* 2:23–54
- Breiman L (2001) Random Forests. *Mach Learn* 45:5–32
- Brohede J, Ellegren H (1999) Microsatellite evolution: polarity of substitutions within repeats and neutrality of flanking sequences. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 266:825–833
- Budó J, Capalleras X, Félix J, Mascort R (2002) Western Hermann's tortoise (*Testudo hermanni hermanni*) in Catalonia. *State Conserv Recovery Proj Chelonii* 3:321–322
- Bush ER, Baker SE, Macdonald DW (2014) Global Trade in Exotic Pets 2006–2012. *Conserv Biol* 28:663–676
- Cade T, Burnham W (2003) Return of the Peregrine. *Peregrine Fund Boise Ida* 394
- Canestrelli D, Aloise G, Cecchetti S, Nascetti G (2010) Birth of a hotspot of intraspecific genetic diversity: notes from the underground. *Mol Ecol* 19:5432–5451
- Canestrelli D, Cimmaruta R, Costantini V, Nascetti G (2006) Genetic diversity and phylogeography of the Apennine yellow-bellied toad *Bombina pachypus*, with implications for conservation. *Mol Ecol* 15:3741–3754
- Canestrelli D, Cimmaruta R, Nascetti G (2008) Population genetic structure and diversity of the Apennine endemic stream frog, *Rana italica*—insights on the Pleistocene evolutionary history of the Italian peninsular biota. *Mol Ecol* 17:3856–3872
- Canestrelli D, Sacco F, Nascetti G (2012) On glacial refugia, genetic diversity, and microevolutionary processes: deep phylogeographical structure in the endemic newt *Lissotriton italicus*. *Biol J Linn Soc* 105:42–55
- Carretero MA, Znari M, Harris DJ, Macé JC (2005) Morphological divergence among populations of *Testudo graeca* from west-central Morocco. *Anim Biol* 55:259–279
- Catchen JM, Amores A, Hohenlohe P, et al (2011) Stacks: building and genotyping Loci de novo from short-read sequences. *G3* 1:171–182
- Chen KY, Marschall EA, Sovic MG, others (2018) assignPOP: An r package for population assignment using genetic, non-genetic, or integrated data in a machine-learning framework. *Methods Ecol Evol* 9:439–446
- Cheylan M (2001) *Testudo hermanni* Gmelin, 1789—Griechische Landschildkröte. *Handb Reptil Amphib Eur* 3:179–289
- Cheylan M (1981) Biologie et écologie de la Tortue d'Hermann (*Testudo hermanni*, Gmelin 1789): contribution de l'espèce à la connaissance des climats quaternaires de la France. Doctoral dissertation

- Chiocchio A, Bisconti R, Zampiglia M, et al (2017) Quaternary history, population genetic structure and diversity of the cold-adapted Alpine newt *Ichthyosaura alpestris* in peninsular Italy. *Sci Rep* 7:2955.
- Ciofi C, Milinkovitch MC, Gibbs JP, et al (2002) Microsatellite analysis of genetic divergence among populations of giant Galápagos tortoises. *Mol Ecol* 11:2265–2283
- CITES (2016) Disposal of confiscated live specimens of species included in the Appendices. Johannesburg (South Africa)
- Cornuet JM, Piry S, Luikart G, et al (1999) New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153:1989–2000
- Cornuet J-M, Ravigné V, Estoup A (2010) Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1. 0). *BMC Bioinformatics* 11:401
- Corti C, Capula M, Luiselli L, et al (2011) Fauna d'Italia, vol. XLV. Reptil Calderini Bologna XII
- Corti C, Lo Cascio P, Razzetti E (2006) Erpetofauna delle isole italiane. *Atlante Degli Anfibi E Dei Rettili D'Italia* 612–643
- Corti C, Zuffi MA (2003) Aspects of population ecology of *Testudo hermanni hermanni* from Asinara Island, NW Sardinia (Italy, Western Mediterranean Sea): preliminary data. *Amphib-Reptil* 24:441–447
- Cox NA, Temple HJ (2009) European red list of reptiles. IUCN, Gland (Switzerland)
- Crandall KA, Bininda-Emonds OR, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends Ecol Evol* 15:290–295
- Crandall KA, Templeton AR (1993) Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134:959–969
- Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, et al (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat Rev Genet* 12:499
- de Broin F de L, Bour R, Parham JF, Perälä J (2006a) Eurotestudo, a new genus for the species *Testudo hermanni* Gmelin, 1789 (Chelonii, Testudinidae). *Comptes Rendus Palevol* 5:803–811
- de Broin F de L, Bour R, Perälä J (2006b) Morphological definition of Eurotestudo (Testudinidae, Chelonii): second part. Elsevier, pp 325–357
- Di Rienzo A, Toomajian C, Sisk B, et al (1995) STR variation in human-populations and their patterns of somatic mutations in cancer-patients. Univ. Chicago Press
- Dodd Jr CK, Seigel RA (1991) Relocation, repatriation, and translocation of amphibians and reptiles: are they conservation strategies that work? *Herpetologica* 336–350
- Donnelly P, Tavaré S (1986) The ages of alleles and a coalescent. *Adv Appl Probab* 18:1–19
- Drechsler R, Vilalta M, Monrós JS (2016) Analysis of movement patterns and macrohabitat use in Hermann's tortoises (*Testudo hermanni hermanni*, Gmelin 1789) reintroduced in a coastal area dominated by pinewood in eastern Spain. *Amphib-Reptil* 37:359–371

- Drechsler RM, Fernandez LM, Lassalle M, Monros JS (2018) Movement patterns and home range sizes of translocated European pond turtles (*Emys orbicularis*, Linnaeus, 1758) in Eastern Spain. *Herpetol Conserv Biol* 13:1–9
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4:359–361.
- Earnhardt JM (1999) Reintroduction programmes: genetic trade-offs for populations. *Anim Conserv Forum* 2:279–286
- Engler M, Parry-Jones R (2007) Opportunity or threat: The role of the European Union in global wildlife trade. TRAFFIC Europe, Brussels
- Ernst C, Barbour R (1989) *Turtles of the World*. AbeBooks
- European Reptile & Amphibian Specialist Group (1996) *Testudo hermanni ssp. hermanni*. The IUCN Red List of Threatened Species
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620
- Ewen JG (2012) *Reintroduction biology: integrating science and management*. John Wiley & Sons
- Ewen JG, Armstrong DP (2007) Strategic monitoring of reintroductions in ecological restoration programmes. *Ecoscience* 14:401–409
- Ewen JG, Soorae PS, Canessa S (2014) Reintroduction objectives, decisions and outcomes: global perspectives from the herpetofauna. *Anim Conserv* 17:74–81
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564–567
- Fèlix J, Budó J, Capalleras X, Mascort R (2006) The fossil register of the genera *Testudo*, *Emys* and *Mauremys* of the Quaternary in Catalonia. *Chelonii* 4:47–51
- Ferri V, Soccini C (2015) *Guida alle tartarughe e testuggini del mondo*. Ricca Editore
- Fischer J, Lindenmayer DB (2000) An assessment of the published results of animal relocations. *Biol Conserv* 96:1–11
- Flecks M, Weinsheimer F, Böhme W, et al (2012) Watching extinction happen: the dramatic population decline of the critically endangered Tanzanian Turquoise Dwarf Gecko, *Lygodactylus williamsi*. *Salamandra* 48:12–20
- Fong JJ, Chen T-H (2010) DNA evidence for the hybridization of wild turtles in Taiwan: possible genetic pollution from trade animals. *Conserv Genet* 11:2061–2066
- Forlani A, Crestanello B, Mantovani S, et al (2005) Identification and characterization of microsatellite markers in Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*, Testudinidae). *Mol Ecol Notes* 5:228–230
- Frankham R (2010) Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biol Conserv* 143:1919–1927
- Frankham R (2008) Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Mol Ecol* 17:325–333

- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2004) A primer of conservation genetics. Cambridge University Press
- Frankham R, Briscoe DA, Ballou JD (2012) Introduction to conservation genetics. Cambridge university press
- Fritz U, Auer M, Bertolero A, et al (2006) A rangewide phylogeography of Hermann's tortoise, *Testudo hermanni* (Reptilia: Testudines: Testudinidae): implications for taxonomy. *Zool Scr* 35:531–543.
- Fritz U, Bininda-Emonds OR (2007) When genes meet nomenclature: tortoise phylogeny and the shifting generic concepts of *Testudo* and *Geochelone*. *Zoology* 110:298–307
- Fritz U, Harris DJ, Fahd S, et al (2009) Mitochondrial phylogeography of *Testudo graeca* in the Western Mediterranean: old complex divergence in North Africa and recent arrival in Europe. *Amphib-Reptil* 30:63–80
- Fritz U, Hundsdörfer AK, Široký P, et al (2007) Phenotypic plasticity leads to incongruence between morphology-based taxonomy and genetic differentiation in western Palearctic tortoises (*Testudo graeca* complex; Testudines, Testudinidae). *Amphib-Reptil* 28:97–121
- Fritz U, Široký P, Kami H, Wink M (2005) Environmentally caused dwarfism or a valid species—Is *Testudo weissingeri* Bour, 1996 a distinct evolutionary lineage? New evidence from mitochondrial and nuclear genomic markers. *Mol Phylogenet Evol* 37:389–401
- Garvin MR, Saitoh K, Gharrett AJ (2010) Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review. *Mol Ecol Resour* 10:915–934
- Georgiadis N, Bischof L, Templeton A, et al (1994) Structure and history of African elephant populations: I. Eastern and southern Africa. *J Hered* 85:100–104
- Gerber AS, Templeton AR (1996) Population sizes and within-deme movement of *Trimerotropis saxatilis* (Acrididae), a grasshopper with a fragmented distribution. *Oecologia* 105:343–350
- Germano JM, Field KJ, Griffiths RA, et al (2015) Mitigation-driven translocations: are we moving wildlife in the right direction? *Front Ecol Environ* 13:100–105
- Gómez-Zurita J, Juan C, Petitpierre E (2000) Sequence, secondary structure and phylogenetic analyses of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in the *Timarcha* leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Mol Biol* 9:591–604
- Goudet, J. (2002) FSTAT, A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices, Version 2.9.3. *J Hered* 86:485–486
- Green R (1997) The influence of numbers released on the outcome of attempts to introduce exotic bird species to New Zealand. *J Anim Ecol* 25–35
- Griffith B, Scott JM, Carpenter JW, Reed C (1989) Translocation as a species conservation tool: status and strategy. *Science* 245:477–480
- Guyot G, Devaux B (1997) Variation in shell morphology and color of Hermann's tortoise, *Testudo hermanni*, in southern Europe. *Chelonian Conserv Biol* 2:390–395
- Hailey A, Willemsen R (2003) Changes in the status of tortoise populations in Greece 1984–2001. *Biodivers Conserv* 12:991–1011
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* 41:95–98

- Hammer JM (2015) Reproduction as a function of living conditions: the breeding biology of the Radiated Tortoise (*Astrochelys radiata*) under natural and captive conditions in Southwest Madagascar. *J Herpetol* 49:633–640
- Hancock J (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. *Microsatellites Evol*, 1–9
- Hansen MM, Kenchington E, Nielsen EE (2001) Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers. *Fish Fish* 2:93–112
- Harding RM, Boyce A, Clegg J (1992) The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. *Genetics* 132:847–859
- Harris DJ, Znari M, Mace J-C, Carretero M (2003) Genetic variation in *Testudo graeca* from Morocco estimated using 12S rRNA sequencing. *Rev Esp Herpetol* 17:5–9
- Harrisson KA, Pavlova A, Telonis-Scott M, Sunnucks P (2014) Using genomics to characterize evolutionary potential for conservation of wild populations. *Evol Appl* 7:1008–1025
- Hartl DL, Clark AG (1997) *Principles of Population Genetics*, Fourth Edition
- Hedrick PW, Savolainen O, Holter L (1996) *Molecular and adaptive variation: a perspective for endangered plants*. United States Department Of Agriculture Forest Service General Technical Report 92-102
- Helyar SJ, Hemmer-Hansen J, Bekkevold D, et al (2011) Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. *Mol Ecol Resour* 11 Suppl 1:123–136
- Hess J, Matala A, Narum S (2011) Comparison of SNPs and microsatellites for fine-scale application of genetic stock identification of Chinook salmon in the Columbia River Basin. *Mol Ecol Resour* 11:137–149
- Hess JE, Campbell NR, Docker MF, et al (2015) Use of genotyping by sequencing data to develop a high-throughput and multifunctional SNP panel for conservation applications in Pacific lamprey. *Mol Ecol Resour* 15:187–202
- Hill S, Hill J (1987) *Richard Henry of Resolution Island*. John McIndoe: Dunedin
- Hoban S, Arntzen JA, Bruford MW, et al (2014) Comparative evaluation of potential indicators and temporal sampling protocols for monitoring genetic erosion. *Evol Appl* 7:984–998
- Hoffman JI, Simpson F, David P, et al (2014) High-throughput sequencing reveals inbreeding depression in a natural population. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:3775–3780
- Hohenlohe PA, Bassham S, Currey M, Cresko WA (2012) Extensive linkage disequilibrium and parallel adaptive divergence across threespine stickleback genomes. *Phil Trans R Soc B* 367:395–408
- Hohenlohe PA, Day MD, Amish SJ, et al (2013) Genomic patterns of introgression in rainbow and westslope cutthroat trout illuminated by overlapping paired-end RAD sequencing. *Mol Ecol* 22:3002–3013
- Honegger R (1974) The reptile trade. *Int Zoo Yearb* 14:47–52
- Horne BD, Poole CM, Walde AD (2011) *Conservation of Asian tortoises and freshwater turtles: setting priorities for the next ten years*. Wildlife Conservation Society, Singapore

- Hu H, Jiang Z (2002) Trial release of Pere David's deer *Elaphurus davidianus* in the Dafeng Reserve, China. *Oryx* 36:196–199
- Hulme PE (2015) Invasion pathways at a crossroad: policy and research challenges for managing alien species introductions. *J Appl Ecol* 52:1418–1424
- IUCN (2000) IUCN guidelines for the placement of confiscated animals. Switzerland IUCN
- IUCN (2013) Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations. Switzerland IUCN
- IUCN (2008) Strategic Planning for Species Conservation: A Handbook The Species Conservation Planning Task Force Species Survival Commission. Switzerland IUCN
- Jakupciak JP, Wells RD (2000) Gene Conversion (Recombination) Mediates Expansions of CTG·CAG Repeats. *Journal of Biological Chemistry* 51:40003–40013
- Jakupciak JP, Wells RD (1999) Genetic instabilities in (CTG·CAG) repeats occur by recombination. *J Biol Chem* 274:23468–23479
- James G, Witten D, Hastie T, Tibshirani R (2013) Resampling methods. An introduction to statistical learning. In *Springer texts in statistics* (pp. 175–201). New York, NY: Springer
- Jeffries DL, Copp GH, Lawson Handley L, et al (2016) Comparing RADseq and microsatellites to infer complex phylogeographic patterns, an empirical perspective in the Crucian carp, *Carassius carassius*, L. *Mol Ecol* 25:2997–3018
- Jombart T (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24:1403–1405
- Jombart T, Ahmed I (2011) adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 27:3070–3071
- Kardos M, Allendorf FW, Luikart G (2014) Evaluating the role of inbreeding depression in heterozygosity-fitness correlations: how useful are tests for identity disequilibrium? *Mol Ecol Resour* 14:519–530
- Karhu A, Hurme P, Karjalainen M, et al (1996) Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers? *Theor Appl Genet* 93:215–221
- Karlsson EK, Baranowska I, Wade CM, et al (2007) Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nat Genet* 39:1321
- Kleiman DG (1989) Reintroduction of captive mammals for conservation. *BioScience* 39:152–161
- Kleiman DG, Mallinson JJ (1998) Recovery and management committees for lion tamarins: partnerships in conservation planning and implementation. *Conserv Biol* 12:27–38
- Kleiman DG, Rylands AB (2002) Lion tamarins: biology and conservation. Smithsonian Institution Press, Washington
- Klemens MW, Moll D (1995) An assessment of the effects of commercial exploitation on the pancake tortoise, *Malacochersus tornieri*. *Tanzan Chelon Cons Biol* 1:197:206
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, et al (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci* 86:6196–6200

- Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, et al (2015) Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol Ecol Resour* 15:1179–1191
- Krohn AR, Conroy CJ, Pesapane R, et al (2018) Conservation genomics of desert dwelling California voles (*Microtus californicus*) and implications for management of endangered Amargosa voles (*Microtus californicus scirpensis*). *Conserv Genet* 19:383–395
- Kuchling G, Skolek-Winnisch R, Bamberg E (1981) Histochemical and biochemical investigation on the annual cycle of testis, epididymis, and plasma testosterone of the tortoise, *Testudo hermanni hermanni* Gmelin. *Gen Comp Endocrinol* 44:194–201
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874
- Kwet A (2005) Rettili e Anfibi d'Europa. Ricca Ed
- La Haye MJJ, Reiners TE, Raedts R, et al (2017) Genetic monitoring to evaluate reintroduction attempts of a highly endangered rodent. *Conserv Genet* 18:877–892
- Lambert MR (1979) Trade and the Mediterranean tortoises. *Oryx* 15:81–82
- Latch E, Rhodes O (2006) Evidence for bias in estimates of local genetic structure due to sampling scheme. *Anim Conserv* 9:308–315
- Lawson DJ, Hellenthal G, Myers S, Falush D (2012) Inference of population structure using dense haplotype data. *PLoS Genet* 8:e1002453
- Leigh JW, Bryant D (2015) popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6:1110–1116
- Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 4:203–221
- Liaw A, Wiener M (2002) Classification and Regression by randomForest. *R News* 2:18–22
- Lischer HEL, Excoffier L (2012) PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics* 28:298–299
- Ljubisavljević K, Džukić G, Kalezić ML (2011) The commercial export of the land tortoises (*Testudo* spp.) from the territory of the former Yugoslavia: a historical review and the impact of overharvesting on wild populations. *North-West J Zool* 2:250–260
- Lo Valvo M, Comigliano G, Cumbo V, et al (2012) Primi risultati di un progetto di restocking di Testuggine di Hermann in un'area protetta della Sicilia nord-occidentale. *Atti IX Congresso Nazionale Societas Herpetologica Italica*
- Lu X, Xu H, Li Z, et al (2014) Genetic diversity and conservation implications of four Cupressus species in China as revealed by microsatellite markers. *Biochem Genet* 52:181–202
- Luikart G, England PR, Tallmon D, et al (2003) The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nat Rev Genet* 4:981
- Madec D (1999) La prédation des pontes dans le processus de raréfaction de la tortue d'Hermann *Testudo hermanni hermanni* dans le massif des Maures (Var). *Dissertation Ecole Pratique des Hautes Etudes Montpellier France*

- Malinsky M, Trucchi E, Lawson DJ, Falush D (2018) RADpainter and fineRADstructure: population inference from RADseq data. *Mol Biol Evol* 35:1284–1290
- Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, et al (2010) Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat Methods* 7:111
- Manel S, Berthier P, Luikart G (2002) Detecting wildlife poaching: Identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes. *Conserv Biol* 16:650–659
- Manel S, Gaggiotti OE, Waples RS (2005) Assignment methods: Matching biological questions with appropriate techniques. *Trends Ecol Evol* 20:136–142
- Masin S, Bonardi A, Padoa-Schioppa E, et al (2014) Risk of invasion by frequently traded freshwater turtles. *Biol Invasions* 16:217–231
- Mateo JA (2011) La Conservación de las Tortugas de Tierra en España. Conselleria de Medi Ambient i Mobilitat Govern de les Illes Balears Palma
- Mazzotti S (2004) Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*): current distribution in Italy and ecological data on a population from the north Adriatic coast (Reptilia, Testudinidae). *Boll Zool* 71:97–102
- Mazzotti S, Bertolucci C, Fasola M, et al (2007) La popolazione di testuggine di Hermann (*Testudo hermanni*) del Bosco della Mesola. *Quaderni Stazione di Ecologia del civico Museo di Storia naturale Ferrara* 17:91-104
- Mazzotti S, Pisapia A, Fasola M (2002) Activity and home range of *Testudo hermanni* in Northern Italy. *Amphib-Reptil* 23:305–312
- Mazzotti S, Vallini C (2000) Seasonal activity and thermal relations of *Testudo hermanni* Gmelin in bare patches of the Bosco della Mesola (Po Delta, Northern Italy). In *Atti I Congresso Societas Herpetologica Italica*. Torino: Museo Regionale di Scienze Naturali 133-137
- McNeely JA, Miller KR, Reid WV, et al (1990) Conserving the world's biological diversity. Switzerland IUCN
- McPhee ME (2003) Effects of captivity on response to a novel environment in the oldfield mouse (*Peromyscus polionotus subgriseus*). *Int J Comp Psychol* 16:85-94
- Miller JM, Coltman DW (2014) Assessment of identity disequilibrium and its relation to empirical heterozygosity fitness correlations: a meta-analysis. *Mol Ecol* 23:1899–1909
- Miller MR, Dunham JP, Amores A, et al (2007) Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Res* 17:240–248
- Mirimin L, Vernesi C, Bertolucci C, et al (2004) Mitochondrial DNA variation and divergence in three Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*) populations. *Ital J Zool* 71:199–201
- Moehrensclager A, Macdonald DW (2003) Movement and survival parameters of translocated and resident swift foxes *Vulpes velox*. Cambridge University Press, pp 199–206
- Montgomery GW, Campbell MJ, Dickson P, et al (2005) Estimation of the rate of SNP genotyping errors from DNA extracted from different tissues. *Twin Res Hum Genet Off J Int Soc Twin Stud* 8:346–352

- Monzón J, Kays R, Dykhuizen DE (2014) Assessment of coyote-wolf-dog admixture using ancestry-informative diagnostic SNPs. *Mol Ecol* 23:182–197
- Morin PA, Leduc RG, Archer FI, et al (2009) Significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium caused by low levels of microsatellite genotyping errors. *Mol Ecol Resour* 9:498–504
- Morin PA, Luikart G, Wayne RK (2004) SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends Ecol Evol* 19:208–216
- Mowry RA, Schneider TM, Latch EK, et al (2015) Genetics and the successful reintroduction of the Missouri river otter. *Anim Conserv* 18:196–206
- Nussear K, Tracy C, Medica P, et al (2012) Translocation as a conservation tool for Agassiz’s desert tortoises: survivorship, reproduction, and movements. *J Wildl Manag* 76:1341–1353
- Ogden R (2011) Unlocking the potential of genomic technologies for wildlife forensics. *Mol Ecol Resour* 11:109–116
- Ogden R, Linacre A (2015) Wildlife forensic science: A review of genetic geographic origin assignment. *Forensic Sci Int Genet* 18:152–159
- Olsson S, Korpelainen H (2013) Single nucleotide polymorphisms found in the red alga *Furcellaria lumbricalis* (Gigartinales): new markers for population and conservation genetic analyses. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* 23:460–467
- van Oppen MJ, Rico C, Turner GF, Hewitt GM (2000) Extensive homoplasy, nonstepwise mutations, and shared ancestral polymorphism at a complex microsatellite locus in Lake Malawi cichlids. *Mol Biol Evol* 17:489–498
- Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol Ecol* 4:347–354
- Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real time estimation of migration rate: a simulation based exploration of accuracy and power. *Mol Ecol* 55–65
- Parham JF, Macey JR, Papenfuss TJ, et al (2006) The phylogeny of Mediterranean tortoises and their close relatives based on complete mitochondrial genome sequences from museum specimens. *Mol Phylogenet Evol* 38:50–64
- Perälä J (2002a) The genus *Testudo* (Testudines: Testudinidae): phylogenetic inferences. *Chelonii* 3:32–39
- Perälä J (2004) *Testudo hercegovinensis* Werner, 1899. *Manouria* 7:19–20
- Perälä J (2002b) Biodiversity in relatively neglected taxa of *Testudo* L., 1758 s. 1. *Chelonii* 3:40–53
- Pérez I, Giménez A, Sánchez-Zapata JA, et al (2004) Non-commercial collection of spur-thighed tortoises (*Testudo graeca graeca*): a cultural problem in southeast Spain. *Biol Conserv* 118:175–181
- Perez JVM, Serra AS (2009) The Quaternary fossil record of the genus *Testudo* in the Iberian Peninsula. Archaeological implications and diachronic distribution in the western Mediterranean. *J Archaeol Sci* 36:1152–1162

- Perez M, Livoreil B, Mantovani S, et al (2014) Genetic variation and population structure in the endangered Hermann's tortoise: the roles of geography and human-mediated processes. *J Hered* 105:70–81
- Peterson BK, Weber JN, Kay EH, et al (2012) Double Digest RADseq: an inexpensive method for *de novo* SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *Plos ONE* 7:e37135
- Petrov BP (2007) Amphibians and reptiles of Bulgaria: fauna, vertical distribution, zoogeography, and conservation. In: *Biogeography and Ecology of Bulgaria*. Springer, pp 85–107
- Phillips BL, Brown GP, Webb JK, Shine R (2006) Invasion and the evolution of speed in toads. *Nature* 439:803
- Piertney SB, Summers R, Marquiss M (2001) Microsatellite and mitochondrial DNA homogeneity among phenotypically diverse crossbill taxa in the UK. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268:1511–1517
- Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M, et al (2004) GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *J Hered* 95:536–539
- Posada D, Crandall KA (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol Evol* 16:37–45
- Primmer CR, Ellegren H, Saino N, Møller AP (1996) Directional evolution in germline microsatellite mutations. *Nat Genet* 13:391
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155:945–959
- Puckett EE, Eggert LS (2016) Comparison of SNP and microsatellite genotyping panels for spatial assignment of individuals to natal range: A case study using the American black bear (*Ursus americanus*). *Biol Conserv* 193:86–93
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9197–9201
- Rašić G, Filipović I, Weeks AR, Hoffmann AA (2014) Genome-wide SNPs lead to strong signals of geographic structure and relatedness patterns in the major arbovirus vector, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* 15:275
- Reed DH, Frankham R (2001) How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55:1095–1103
- Richard G, Pâques F (2000) Mini-and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO Rep* 1:122–126
- Richards RI, Sutherland GR (1994) Simple repeat DNA is not replicated simply. *Nat Genet* 6:114
- Rodriguez JD, Perez A, Lozano JA (2010) Sensitivity analysis of k-fold cross validation in prediction error estimation. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* 32:569–575
- Roques S, Berrebi P, Rochard E, Acolas ML (2018) Genetic monitoring for the successful restocking of a critically endangered diadromous fish with low diversity. *Biol Conserv* 221:91–102
- Rousset F (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour*

- Routman E, Wu R, Templeton AR (1994) Parsimony, molecular evolution, and biogeography: the case of the North American giant salamander. *Evolution* 48:1799–1809
- Sacchi R, Pupin F, Rosa DP, Fasola M (2007) Bergmann's rule and the Italian Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*): latitudinal variations of size and shape. *Amphib-Reptil* 28:43–50
- Scott JM, Carpenter JW (1987) Release of captive-reared or translocated endangered birds: what do we need to know? *The Auk* 104:544–545
- Scott JM, Goble DD, Haines AM, et al (2010) Conservation-reliant species and the future of conservation. *Conserv Lett* 3:91–97
- Seddon PJ (1999) Persistence without intervention: assessing success in wildlife reintroductions. *Trends Ecol Evol* 14:503
- Seddon PJ, Armstrong DP, Maloney RF (2007) Developing the Science of Reintroduction Biology. *Conserv Biol* 21:303–312
- Seeb JE, Carvalho G, Hauser L, et al (2011) Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. *Mol Ecol Resour* 11:1–8
- Seigel RA, Dodd Jr CK (2000) Manipulation of turtle populations for conservation: Half-way technologies or viable options? Chapter 9. 218-238
- Serena, M. (ed.) (1994). *Reintroduction Biology of Australian and New Zealand Fauna*. Surrey Beatty and Sons Chipping Norton, Australia.
- Shafer AB, Wolf JB, Alves PC, et al (2015) Genomics and the challenging translation into conservation practice. *Trends Ecol Evol* 30:78–87
- Sindaco R (2006) *Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia*. Edizioni Polistampa
- Široký P, Fritz U (2007) Is *Testudo wernerii* a distinct species? *Biologia (Bratisl)* 62:228–231
- Soorae PS (2008) Global re-introduction perspectives: re-introduction case-studies from around the globe. IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group & Environment Agency-Abu Dhabi
- Soorae PS (2010) Global re-introduction perspectives: Additional case studies from around the globe. IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group & Environment Agency-Abu Dhabi
- Soorae PS (2011) Global re-introduction perspectives, 2011: more case studies from around the globe. IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group & Environment Agency-Abu Dhabi
- Soorae PS (2013) Global Re-introduction Perspectives, 2013: Further Case Studies from Around the Globe. IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group & Environment Agency-Abu Dhabi
- Soorae PS (2016) Global Re-introduction Perspectives, 2016: Further Case Studies from Around the Globe. IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group & Environment Agency-Abu Dhabi
- Soorae PS (2018) Global Re-introduction Perspectives, 2018: Further Case Studies from Around the Globe. IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group & Environment Agency-Abu Dhabi
- Sork VL (2015) Gene flow and natural selection shape spatial patterns of genes in tree populations: implications for evolutionary processes and applications. *Evol Appl* 9:291–310
- Spagnesi M, Toso S (1997) Analisi critica degli aspetti sanitari delle immissioni faunistiche. In: *Atti del III Convegno Nazionale dei Biologi della Selvaggina*. Suppl. Ric. Biol. Selvaggina, XXVII: 39-46

- Spalton JA, Lawrence M, Brend S (1999) Arabian oryx reintroduction in Oman: successes and setbacks. *Oryx* 33:168–175
- Stanley Price MRS (1989) *Animal reintroductions: the Arabian oryx in Oman*. Cambridge University Press
- Stanley Price MS, Soorae P (2003) Reintroductions: whence and whither? *Int Zoo Yearb* 38:61–75
- Stearns SC (1989) The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *Bioscience* 39:436–445
- Strauss SY, Lau JA, Carroll SP (2006) Evolutionary responses of natives to introduced species: what do introductions tell us about natural communities? *Ecol Lett* 9:357–374
- Stubbs D, Swingland IR (1985) The ecology of a Mediterranean tortoise (*Testudo hermanni*): a declining population. *Can J Zool* 63:169–180
- Stubbs D, Swingland IR, Hailey A, Pulford E (1985) The ecology of the mediterranean tortoise *Testudo hermanni* in northern Greece (the effects of a catastrophe on population structure and density). *Biol Conserv* 31:125–152
- Summers RW, Jardine DC, Marquiss M, Rae R (2002) The distribution and habitats of crossbills *Loxia spp.* in Britain, with special reference to the Scottish Crossbill *Loxia scotica*. *Ibis* 144:393–410
- Sutherland WJ, Armstrong D, Butchart SH, et al (2010) Standards for documenting and monitoring bird reintroduction projects. *Conserv Lett* 3:229–235
- Sutton AE, Lopez R (2014) Findings from a survey of wildlife reintroduction practitioners. *F1000Research* 3:29
- Swingland IR, Klemens MW (1989) *The conservation biology of tortoises*. Switzerland IUCN
- Sylvester EVA, Bentzen P, Bradbury IR, et al (2018) Applications of random forest feature selection for fine-scale genetic population assignment. *Evol Appl* 11:153–165
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132:619–633
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Tuberville TD, Norton TM, Todd BD, Spratt JS (2008) Long-term apparent survival of translocated gopher tortoises: a comparison of newly released and previously established animals. *Biol Conserv* 141:2690–2697
- Türkozan O, Özdemir A, Kiremit F (2008) International *Testudo* trade. *Chelonian Conserv Biol* 7:269–274
- Vamberger M, Corti C, Stuckas H, Fritz U (2011) Is the imperilled spur-thighed tortoise (*Testudo graeca*) native in Sardinia? Implications from population genetics and for conservation. *Amphib-Reptil* 32:9–25
- Van Bers N, Crooijmans R, Groenen M, et al (2012) SNP marker detection and genotyping in tilapia. *Mol Ecol Resour* 12:932–941

- van der Kuyl AC, Ballasina DLP, Dekker JT, et al (2002) Phylogenetic relationships among the species of the genus *Testudo* (Testudines: Testudinidae) inferred from mitochondrial 12S rRNA gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 22:174–183
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538
- Vetter H (2006) La tortuga mediterránea: *Testudo hermanni*. Reptilia Ediciones; Fráncfort del Meno: Edition Chimaira
- Via S (1993) Adaptive phenotypic plasticity: target or by-product of selection in a variable environment? *Am Nat* 142:352–365
- Vilà C, Amorim IR, Leonard JA, et al (1999) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Mol Ecol* 8:2089–2103
- Vilà M, Basnou C, Pyšek P, et al (2010) How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services? A pan-European, cross-taxa assessment. *Front Ecol Environ* 8:135–144
- Vitousek PM, D'antonio CM, Loope LL, et al (1997) Introduced species: a significant component of human-caused global change. *N Z J Ecol* 1–16
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10:506–513
- Wang J (2017) The computer program structure for assigning individuals to populations: easy to use but easier to misuse. *Mol Ecol Resour* 17:981–990
- Watterson G, Guess HA (1977) Is the most frequent allele the oldest? *Theor Popul Biol* 11:141–160
- Weber JL (1990) Informativeness of human (dC-dA) n·(dG-dT) n polymorphisms. *Genomics* 7:524–530
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370
- Wermuth H (1952) *Testudo hermanni robertmertensi* n. subsp. und ihr Vorkommen in Spanien. *Senckenbergiana* 33:157–164
- Willemsen R, Hailey A (1999a) Variation of adult body size of the tortoise *Testudo hermanni* in Greece: proximate and ultimate causes. *J Zool* 248:379–396
- Willemsen RE, Hailey A (1999b) A latitudinal cline of dark plastral pigmentation in the tortoise *Testudo hermanni* in Greece. *Herpetol J* 9:125–132
- Willemsen RE, Hailey A (2002) Body mass condition in Greek tortoises: regional and interspecific variation. *Herpetol J* 12:105–114
- Wolf CM, Griffith B, Reed C, Temple SA (1996) Avian and mammalian translocations: update and reanalysis of 1987 survey data. *Conserv Biol* 10:1142–1154
- Xing C, Schumacher FR, Xing G, et al (2005) Comparison of microsatellites, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and composite markers derived from SNPs in linkage analysis. *BMC Genet* 6:S29
- Xu Q-S, Liang Y-Z (2001) Monte Carlo cross validation. *Chemom Intell Lab Syst* 56:1–11

- Young HS, Parker IM, Gilbert GS, et al (2017) Introduced Species, Disease Ecology, and Biodiversity–Disease Relationships. *Trends Ecol Evol* 32:41–54
- Zardoya R, Vollmer DM, Craddock C, et al (1996) Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *Proc R Soc Lond B* 263:1589–1598
- Zenboudji S, Cheylan M, Arnal V, et al (2016) Conservation of the endangered Mediterranean tortoise *Testudo hermanni hermanni*: The contribution of population genetics and historical demography. *Biol Conserv* 195:279–291